CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

GENOTIPIFICACIÓN DE *Perkinsus marinus* E INMUNOGENÓMICA DE *Crassostrea corteziensis* INFECTADO CON *P. marinus* AISLADO DEL NOROESTE DE MÉXICO

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Acuicultura)

P r e s e n t a
CRISTINA ESCOBEDO FREGOSO

La Paz, Baja California Sur, Marzo de 2014

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 06 del Mes de Marzo 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:

"Genotipificación de *Perkinsus marinus* e inmunogenómica de *Crassostrea corteziensis* infectado con *P. marinus* aislado del Noroeste de México"

Presentada por el alumno:

Cristina Escobedo Fregoso

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura

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

Dr. RICARDO VÁZQUEZ JUÁREZ
DIRECTOR DE TESIS

Dra. GRACIA ALICIA GÓMEZ ANDURO
CO-TUTOR

Dr. FELIPE DE JESÚS ASCENCIO VALLE
CO-TUTOR

Dra. ISABELLE ARZUL
CO-TUTOR

Dr. JORGE RAMÍREZ CALDERÓN
CO-TUTOR

DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Ricardo Vázquez Juárez (Director de tesis, CIBNOR)

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle (Cotutor, CIBNOR)

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro (Cotutor, CIBNOR)

Dr. Jorge Ramírez Salcedo (Cotutor, UNAM)

Dra. Isabelle Arzul (Cotutor, IFREMER)

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Dr. Jorge Ramírez Salcedo

Dra. Isabelle Arzul

JURADO DE EXÁMEN

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Dr. Jorge Ramírez Salcedo

Dra. Isabelle Arzul

Dr. Edouard Kraffe (Suplente)

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova (Suplente)

RESUMEN

La prevalencia del protozoario *Perkinsus marinus* fue evaluada en branquias del ostión de placer *Crassostrea cortezienisis* de dos esteros de Nayarit, México. El protozoario fue identificado mediante la amplificación por PCR de la región de espaciadores inter transcritos (ITS) del ADNr de *Perkinsus* spp. El patógeno fue encontrado en 92% de los ostiones de Boca de Camichín y 77% de los ostiones de Pozo Chino. Las secuencias ITS presentaron del 96–100% de similitud con *P. marinus*. La secuencia ITS mas frecuente (JQ266236) presentó 100% de identidad con el locus ITS de *P. marinus* de Nueva Jersey, Maryland, Carolina del Sur y Texas, y la segunda secuencia mas frecuente (JQ266240) mostró 100% de identidad con el ITS de *P. marinus* de Nueva Jersey, Carolina del Sur, Louisiana y Bahía Kino, Sonora, México. Las 14 secuencias de la región de espaciadores no transcritos (NTS) presentaron 98% de similitud con *P. marinus* de Texas. El polimorfismo mas frecuente se identificó en la posición nucleotídica 446 de la región ITS, sin embargo, el NTS fue la región mas polimórfica, sugiriendo que esta región es adecuada para identificación de genotipos, y la región mas conservada que fue el ITS es mejor para diagnóstico específico. Las secuencias ITS y NTS de *P. marinus* obtenidas de *C. corteziensis* fueron agrupadas en dos clados, identificando dos variantes alélicas de *P. marinus*.

Mediante la amplificación por PCR de la región ITS de *P. marinus,* se identificó el protozoario en ostiones *C. cortezienisis* de Baja California Sur, México (KJ458987) que presentó 100% de identidad con *P. marinus* de Nayarit, México (JQ266240). La prevalencia en ostiones de BCS fue de 100% con intensidades 1–2, que fue mayor a ostiones de Nayarit (83.34%) con intensidades de 0–5. La intensidad de *P. marinus* en *C. corteziensis* aumentó de 1–2 a 2–5 con el incremento de la temperatura en condiciones experimentales. *P. marinus* causó 43.6% de mortalidad en ostiones inyectados con *P.* marinus, demostrando que *C. corteziensis* es susceptible a alta a altas dosis de *P. marinus*. Diferentes niveles de infección se registraron en ostiones inyectados con *P. marinus* a pesar de estar cohabitando. A partir de los 3 arreglos de ostiones con dos condiciones de infección natural por *P. marinus* procedentes de Nayarit y BCS, y de ostiones infectados experimentalmente, se obtuvieron 166 genes candidatos para ser genes de referencia. Se obtuvo que los genes RPL10, GAPDH, RPL10 fueron los mas estables, y el gen ACT–β fue el mas inestable. Los mecanismos de respuesta inmune identificados para *C. corteziensis* con bajas infecciones fueron: Receptores Toll, factor nuclear NF–κβ, autofagia, apoptosis y estrés oxidativo, y para ostiones con altas infecciones se identificaron genes de los procesos de inhibición de apoptosis y regulación negativa de apoptosis, y genes involucrados en la activación del factor nuclear NF–κβ. Genes involucrados en fagocitosis se presentaron en todas las condiciones de infección. Ostiones con bajas infecciones de *P. marinus* presentaron mayores niveles de expresión relativa respecto a ostiones con altas infecciones del inhibidor de serine proteasas, *Duox* o NADPH–oxidasa y ACT–β

involucrados en la fagocitosis, el antioxidante SOD y GST, LPTNF y ECSIT que participan en la traslocación del factor NF–κβ activando genes de respuesta inmune, caspasas CAS8, inhibidores de apoptosis B–IAP y B–IAP2 y el fragmentador de ADN que participan en la apotosis. Peroxidasin, caspasa 3 e NF-K-Inh no presentaron diferencias entre condiciones de infección.

Mediante secuenciación RNA–Seq Illumina 2000, se obtuvieron 133,814,590 lecturas de 100 pb, y del ensamblaje del transcriptoma de *C. corteziensis* realizado con CLC se obtuvieron 105,000 contigs con una longitud N50 de 918 pb. En este estudio se generó una aproximación transcriptomica de *C. corteziensis,* contribuyendo al conocimiento genómico de la especie, y a la identificación de genes en respuesta ante *P. marinus*.

Se considera que el conjunto de la alta expresión relativa de inhibidores de serine proteasas, activación de los procesos de inflamación y apoptosis, contrarrestan la proliferación de *P. marinus* en *C. corteziensis.* La información generada permitirá profundizar en genes específicos que confieren resistencia ante patógenos.

Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Vo. Bo. Director de tesis

ABSTRACT

Prevalence of the protozoan *Perkinsus marinus* in the gills of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from two estuaries in Nayarit, Mexico, was measured. The protozoan was identified by PCR amplification of the internal transcribed spacer (ITS) region of the rDNA of *Perkinsus* spp. The pathogen was found in 92% of oysters from Boca de Camichín and 77% of oysters from Pozo Chino. ITS sequences characterized from *C. corteziensis* showed 96–100% similarity to *P. marinus*. The most frequent ITS sequence, (GenBank JQ266236) had 100% identity with the ITS locus of *P. marinus* from New Jersey, Maryland, South Carolina, and Texas, and the second most frequent observed sequence (GenBank JQ266240) was 100% identical to ITS sequences of *P. marinus* from New Jersey, South Carolina, Louisiana, and Bahía Kino, Sonora, Mexico. The 14 sequences from the non-transcribed spacer (NTS) showed 98% similarity to *P. marinus* from Texas. The most frequent polymorphism identified was at nucleotide 446 of the ITS region, however, the NTS showed the highest nucleotide diversity, thereby suggesting that this region is suitable for genotype identification. Moreover, the most conserved ITS marker is better for species-specific diagnosis. Both the ITS and NTS sequences of *P. marinus* obtained from *C. corteziensis* were grouped in two clades, identifying two allelic variants of *P. marinus.*

P. marinus was identified in *C. cortezienisis* from BCS, Mexico culture (KJ458987). The *Perkinsus* ITS region amplified by PCR was 100% identity to *P. marinus* from Nayarit, Mexico (JQ266240). Prevalence in BCS oysters was 100% with *P. marinus* intensity 1–2, which was higher than Nayarit oysters (83.34%) with intensities 0–5. *P. marinus* intensity was increased from 1–2 to 2–5 when temperature was experimentally increased. The protozoan caused mortalities in 43% oysters injected with *P. marinus*, demonstrating the *C. cortezienisis* susceptibility to high *P. marinus* doses. Although, oysters injected with *P. marinus* were in cohabitation, oysters showed different infection levels. From tree arrays hybridized with oyster from two natural *P. marinus* infection from Nayarit and BCS, and experimental infection oysters, 166 candidates reference genes were obtained. RPL10, GAPDH, RPL10 genes were the most stables until ACT–β gene was the less stable. The Immune response mechanisms in *C. corteziensis* with low infection were: Toll receptors, nuclear factor, NF–κβ, autophagy, apoptosis and oxidative stress, until oyster with high infections show negative apoptosis regulation, and genes involved in factor nuclear NF–κβ activation. Phagocytosis genes were in all infection conditions. Oysters with low infection showed higher relative expression levels of serine proteases inhibitor, *Duox* or NADPH–oxidase and ACT–β involved in phagocytosis, the transcripts of antioxidant SOD and GST, LPTNF and ECSIT involved in translocation nuclear factor NF–κβ to activate the immune genes transcription, caspase 8, apoptosis inhibitors B–IAP and B–IAP2, and DNA fragmentation involved in apoptosis. Peroxidasin, caspase 3 and NF–K–Inh had no differences between infection conditions.

Transcriptomic approach was sequenced by RNA–Seq Illumina 2000, obtained 133,814,590 reads of 100 pb. Reads were assembly by CLC, obtained 105,000 contigs with N50 length of 918 bp. Our study generated a *C. corteziensis* transcriptome approach, contributing to genomic knowledge of *C. corteziensis,* and were identified immune genes in response to *P. marinus*.

Is considered that the over relative expression of serine proteases inhibitors, apoptosis and inflammation activation processes, offset *P. marinus* proliferation in *C. corteziensis*. The information generated will direct studies to focus on specific genes that confer resistance to pathogens.

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado de CIBNOR dirigido por la Dra. Elisa Serviere Zaragoza, y a todas las facilidades otorgadas por el departamento que me apoyó para mi formación académica mediante cursos, estancias y congresos. A Horacio Sandoval G. por todo su apoyo computacional. A los editores de CIBNOR, Diana Dorantes Salas e Ira Fogel.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con registro 161576, y por la beca mixta internacional otorgada en el 2010. Al proyecto SEP–CONACYT 106887 que financió este trabajo.

A mi director de tesis Dr. Ricardo Vázquez Juárez, por formarme, por creer en mí, por inculcarme el arte de amar a la ciencia sin interés y darme la visión de compartir, por apoyarme en cualquiera que fueran mis intereses académicos. Gracias Ricardo por ser el amigo en tantos momentos divertidos con el grupo, por las anécdotas graciosas y por todo el apoyo en momentos difíciles.

A mis tutores Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle, Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro y Dr. Jorge Ramírez Salcedo por sus aportaciones a este trabajo. A Edouard Kraffe por sus consejos y revisiones.

A mi asesora Dra. Isabelle Arzul por recibirme y apoyarme incondicionalmente en la estancia en su laboratorio en Ifremer, La Tremblade, Francia y a su equipo de trabajo: Bruno Chollet y Maeva Robert que me enseñaron mucho en poco tiempo. Merci beaucoup Isabelle por darte el tiempo para aportar tantos consejos para este trabajo.

A Noelia Carrasco por su apoyo, compromiso y por apoyarme durante la estancia en su laboratorio en IRTA, Sant Charles de La Rapita, España, y a la técnico Beatriz Lacuesta. Noelia gracias por tu amistad y por hacer que me sintiera como en casa.

A José Luis Santillán, Lorena Chávez González, Simón Guzmán León, y Jorge Ramírez Salcedo de la Unidad de microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por el apoyo en tantos cursos, por su paciencia y por compartir su conocimiento.

A los comités de sanidad acuícola CESANAY y CESABCS por facilitarme organismos para desarrollar parte de esta tesis.

A la Dra. María de Jesús Durán y al Dr. Norberto Vivanco de la UAN por facilitarnos las instalaciones de su laboratorio y apoyarnos en todo lo necesario. A la técnico Fabiola y a todos los chicos por su apoyo en el laboratorio de la UAN.

A las facilidades, apoyo y al aprendizaje otorgado por Carmen Rodríguez Jaramillo y Eulalia M. Méza Chávez del laboratorio de histología que me dejaron sembrado el gusto por la histología. Gracias por tantas horas compartidas, por el apoyo y sobre todo por sus consejos y amistad.

Al laboratorio de biología molecular representado por Neftalí Gutiérrez Rivera por permitirme trabajar en su laboratorio.

A Pablo Monsalvo Spencer y Gabriel Robles Villegas por su apoyo incondicional en el mantenimiento de organismos.

A Julián A. Garzón Favela y a todo el personal del laboratorio de microalgas por facilitarme microalgas.

A Raúl A. Llera Herrera por impulsarme a realizar este trabajo, por el gran apoyo académico, por las tantas charlas, por las lecciones de vida, y por todo lo compartido.

A mis queridos amigos Ayin y Mariana que siempre están pendientes, por todo su apoyo durante este trabajo, por sus aportaciones a él, por su ayuda en los muestreos, por tantos momentos divertidos, por sus consejos, pero sobre todo por su gran amistad.

A Laura Guzmán por ser una gran amiga, por las interminables pláticas, por tu apoyo en todos los aspectos de mi vida, por las horas de discusiones, y por ser una gran persona.

A Julio Hernández González por todo el conocimiento discutido, por tus enseñanzas que quedaron plasmadas en la discusión de este trabajo, por las largas pláticas y artículos compartidos, por tu paciencia, por darme tranquilidad, y por ser un gran amigo.

A mi grupo que me hace sentir que el compartir es aprender: Ayin, Edwin, Lilian, Julio, Carmen, Lorena, y Alejandro.

A todas esas personitas con quienes compartí tantos ratos en los laboratorios: Mario R., Yanina, Citlali, Lorena V., Pablo, Sergio, Rosy, Ilhui, Sara, Anais, Erika, Martita, Carlos, Normichis, Esthersita, Angie, Esteban, Cabada, Romo, Emmanuel, Diana.

A mis amigas de afuera de este mundo de CIBNOR, por hacerme ver que hay algo más. Y a todos aquellos que estuvieron en esta hermosa etapa del doctorado.

A mi familia por estar en todos los momento de esta etapa. Mamá gracias por todas las enseñanzas y su apoyo para iniciar, continuar y terminar esta etapa, pero sobre todo por su

gran amor y amistad. A mi papá por su gran tenacidad en guiarme en este camino. A mis hermanos Anahi y Damian por sus ánimos para conseguir esta meta y por su amor, así como a David y a mi linda sobrina Danae, los amo familia. Gracias abuelitos por su apoyo eterno, y por su gran madurez que me han enseñado a luchar. A mi gran familia que siempre me han apoyado y por estar siempre pendientes de mí, los quiero.

A todos los que aportaron a que este trabajo pudiera realizarse y a todos los que lean este documento.

A mis amigos

A mis nenitas....

ÍNDICE DE CONTENIDO

COMITÉ TUTORIAL....II
RESUMEN....III
ABSTRACT....V
AGRADECIMIENTOS....VII
1 INTRODUCCIÓN....1
2 ANTECEDENTES....3
2.1 Morfología de *Perkinsus* sp. 3
2.2 Ciclo de vida del protozoario....4
2.3 Técnicas de diagnóstico para *Perkinsus* sp. 4
2.4 Variabilidad intraespecífica....5
2.4.1 Genotipos de *P. marinus*....6
2.5 Aspectos generales de *Crassostrea* sp. 6
2.6 Sistema inmune de ostiones....7
2.6.1 Respuesta inmune celular ante *Perkinsus* sp. 7
2.6.2 Respuesta inmune humoral....8
2.7 Efectos en el hospedero....9
3 JUSTIFICACIÓN....10
4 OBJETIVO GENERAL....12
4.1 Objetivos particulares....12
5 HIPÓTESIS....13
6 METODOLOGÍA....14
6.1 Colecta de organismos....14
6.2 Prevalencia de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis*....15
6.2.1 Extracción de ADN....15
6.2.2 Amplificación por PCR de la región ITS de *Perkinsus*....15
6.3 Evaluación de posibles coinfecciónes de *Perkinsus* sp. 16
6.3.1 Análisis de restricción enzimática....16
6.4 Análisis filogenético de *P. marinus*....18
6.4.1 Amplificación de la región NTS....19
6.4.2 Clonación y secuenciación de las regiones ITS y NTS....19
6.4.3 Análisis bioinformático de las secuencias ITS y NTS....20
6.5 Análisis de intensidad de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis*....20
6.5.1 Incubación en FMT de branquias y sistema digestivo de *C. corteziensis*....20
6.5.2 Incubación en FMT del tejido completo de *C. corteziensis*....21
6.6 Análisis histopatológico....21
6.6.1 Histología convencional....21
6.6.1.1 Evaluación de la condición reproductiva....22
6.6.2 Hibridación *in situ*....22

6.7 Propagación de *P. marinus*.....23
6.8 Infección de *C. corteziensis* con *P. marinus*.....24
6.9 Análisis de expresión génica.....26
6.9.1 Extracción de ARN.....26
6.9.2 Secuenciación del transcriptoma de *C. corteziensis*.....26
6.9.2.1 Verificación de la calidad de las lecturas generadas con RNA–Seq.....27
6.9.2.2 Limpieza de lecturas.....27
6.9.2.3 Ensamblaje *de novo* del transcriptoma de *C. corteziensis*.....29
6.9.2.4 Anotación del transcriptoma de *C. corteziensis*.....29
6.9.3 Hibridización de microarreglos.....30
6.9.3.1 Análisis de microarreglos.....31
6.9.3.2 Selección de genes de referencia y genes de respuesta inmune.....31
6.9.3.3 Síntesis de ADNc para la validación de genes específicos.....32
6.9.3.4 Amplificación de genes por PCR punto final.....33
6.9.3.5 Cuantificación de la expresión relativa por qPCR.....33
7 RESULTADOS.....35
7.1 Prevalencia de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis*.....35
7.2 Intensidad de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis*.....35
7.3 Análisis histológico de *C. corteziensis* infectado con *Perkinsus* sp. 40
7.3.1 Hibridación *in situ*.....40
7.4 Evaluación de coinfecciones mediante restricción del ITS de *Perkinsus* sp. 43
7.5 Análisis de variabilidad génica de *P. marinus* en *C. corteziensis*.....47
7.5.1 Variabilidad génica del ITS de *P. marinus* en *C. corteziensis* de Nayarit.....47
7.5.2 Homología del ITS de *Perkinsus*.....47
7.5.3 Filogenia del ITS de *P. marinus*.....51
7.6 Variabilidad génica del NTS de *P. marinus* de *C. corteziensis* de Nayarit.....53
7.6.1 Polimorfismo en el NTS de *P. marinus*.....53
7.6.2 Similitud de la región NTS de *Perkinsus*.....53
7.6.3 Análisis filogenético del NTS de *P. marinus*.....54
7.7 Diversidad nucleotídica.....55
7.8 Cultivo de *P. marinus*.....56
7.9 Prevalencia e intensidad de *P. marinus* en *C. corteziensis* de BCS 57
7.9.1 Identificación de *P. marinus* en *C. corteziensis* cultivado en BCS.....57
7.9.2 Prevalencia de *P. marinus* en *C. corteziensis* cultivado en BCS.....58
7.10 Aproximación transcriptomica de *C. corteziensis* mediante RNA–Seq.....62
7.10.1 Calidad del ARN para secuenciación.....62
7.10.2 Verificación de la calidad de las lecturas de RNA–Seq.....66
7.11 Anotación del transcriptoma de *C. corteziensis*.....74
7.12 Selección de potenciales candidatos a ser genes de referencia.....77
7.13 Verificación de la calidad del ARN, eliminación de ADN y retrotranscripción.....79

7.14 Estabilidad de genes de referencia.....81
7.15 Identificación de procesos biológicos de *C. corteziensis* infectado por *P. marinus* 83
7.16 Identificación de los procesos de respuesta inmune.....87
7.16.1 Niveles de expresión de genes de respuesta inmune.....100
8 DISCUSIÓN.....106
8.1 Prevalencia de *P. marinus* en *C. corteziensis* de Nayarit.....106
8.2 Coinfecciones por *Perkinsus* sp. 108
8.3 Intensidad de *P. marinus* en ostiones cultivados en Nayarit.....109
8.4 Histopatología de ostiones de Nayarit.....110
8.5 Filogenia del ITS de *P. marinus* de Nayarit.....111
8.6 Filogenia del NTS de *P. marinus* de Nayarit.....113
8.7 Diversidad nucleotídica.....113
8.8 Identificación, prevalencia e intensidad de *P. marinus* en *C. corteziensis* de BCS. 114
8.9 Susceptibilidad de *C. corteziensis* ante *P. marinus*.....115
8.10 Genes de referencia.....117
8.11 Procesos de respuesta inmune de *C. corteziensis* ante *P. marinus*.....118
8.12 Inhibidores de serine proteasas.....124
8.13 Genes que participan en la fagocitosis.....125
8.14 Genes que participan en la señalización del proceso inflamatorio 127
8.15 Genes implicados en la apoptosis.....128
8.16 Aproximación transcriptomica de *C. corteziensis*.....128
9 CONCLUSIONES.....131
10 LITERATURA CITADA.....133
ANEXO I.....142
ANEXO II.....145

LISTADO DE FIGURAS

Fig. 1. Tejidos de *C. corteziensis* muestreados..... 14
Fig. 2. Sitios de colectada de *C. corteziensis*..... 15
Fig. 3. Diagrama de flujo para obtener las secuencias de *P. marinus*..... 18
Fig. 4. Diagrama de flujo para la obtención de genes del sistema inmune..... 25
Fig. 5. Células de *Perkinsus* sp. teñidas con lugol..... 36
Fig. 6. Intensidad de *Perkinsus* sp. 37
Fig. 7. Intensidad de *Perkinsus* sp. en hembras y machos *C. corteziensis*..... 38
Fig. 8. Condición reproductiva en relación a la intensidad de la infección por *P. marinus*. 39
Fig. 9. Trofozoitos intracelulares de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis*..... 40
Fig. 10. Hibridación *in situ* de *Perkinsus* sp. 42
Fig. 11. Fragmentos del ITS de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis* de Boca de Camichín..... 43
Fig. 12. Fragmentos de ITS de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis* del Estero Pozo Chino.… 45
Fig. 13. Árbol filogenético de la región ITS de *P. marinus* de ostiones de Nayarit..... 52
Fig. 14. Porcentaje de ostiones con diferentes variantes del ITS de *P. marinus*..... 53
Fig. 15. Árbol filogenético de la región NTS de *P. marinus*..... 54
Fig. 16. Diversidad nucleotídica de los marcadores NTS, ITS de *P. marinus*..... 55
Fig. 17. Cultivo de *P. marinus* en DME–Ham's F12..... 57
Fig. 18. Porcentaje de ostiones clasificados por niveles de infección por *P. marinus*..... 58
Fig. 19. Porcentaje de ostiones clasificados por niveles de infección por *P. marinus* en ostiones inyectados con solución salina e inyectados con *P. marinus*..... 59
Fig. 20. Porcentaje de mortalidad acumulada..... 59
Fig. 21. Amplificación del ITS de *Perkinsus*..... 60
Fig. 22. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la integridad del ARN..... 62
Fig. 23. Electroferogramas del ARN..... 63
Fig. 24. Electroferogramas de las librerías.....65
Fig. 25. Calidad de las lecturas por posición nucleotídica..... 67
Fig. 26. Distribución de la longitud de las lecturas obtenidas por secuenciación RNA–Seq 68
Fig. 27. Porcentaje de nucleótidos ambiguos por posición nucleotídica..... 68
Fig. 28. Distribución de la calidad de las secuencias..... 69
Fig. 29. Distribución del contenido de GC de las lecturas..... 70
Fig. 30. Distribución del contenido de GC por posición nucleotídica..... 70
Fig. 31. Distribución del porcentaje del contenido de bases por posición nucleotídica..... 71
Fig. 32. Niveles de duplicación de secuencias..... 72
Fig. 33. Número de secuencias con Blast hits y anotadas con Blast2Go, del ensamblaje del transcriptóma de *C. corteziensis*..... 74
Fig. 34. Número de Blast hits por especie obtenidas para el ensamblaje del transcriptóma de *C. corteziensis*..... 75

Fig. 35. No. se secuencias clasificadas por términos ontológicos del transcriptóma de *C. corteziensis*..... 76
Fig. 36. Número de genes comunes (Z–score < 1) entre los arreglos A, B, y C..... 78
Fig. 37. Evaluación de la integridad del ARN 79
Fig. 38. Evaluación de la eliminación de ADN y evaluación de la retrotranscripción..... 80
Fig. 39. Amplificación de genes de referencia para *C. corteziensis*..... 80
Fig. 40. Amplificación de genes de referencia de *C. corteziensis* por PCR punto final..... 81
Fig. 41. Estabilidad de genes de referencia..... 82
Fig. 42. Procesos biológicos identificados en *C. corteziensis* de Nayarit 84
Fig. 43. Procesos biológicos identificados en *C. corteziensis* de BCS..... 85
Fig. 44. Procesos biológicos identificados en *C. corteziensis* experimentales..... 86
Fig. 45. Numero de genes por procesos de respuesta inmune de *C. corteziensis*..... 88
Fig. 46. Interactoma de genes de ostiones con infecciones altas..... 95
Fig. 47. Interactoma de genes de ostiones con infecciones bajas..... 96
Fig. 48. Interacción de genes que participan en la traslocación del factor nuclear NF–κβ. 97
Fig. 49. Interacción de genes que participan en el fagosoma..... 98
Fig. 50. Interacción de genes que participan en la apoptosis..... 99
Fig. 51. Expresión relativa del inhibidor de serine proteasas..... 102
Fig. 52. Expresión relativa de DUOX, PEROX, GST, SOD y ACT–β..... 103
Fig. 53. Expresión relativa de LPTNF, ECSIT, NF–K–INH..... 104
Fig. 54. Expresión relativa de CAS8, CAS3, B–IAP, B–IAP2 y DNA–FRAG..... 105

LISTADO DE TABLAS

Tabla I. Patrón de digestión con *Rsa*I y con *Hinf*I.....17
Tabla II. Número de adaptadores por librería.....28
Tabla III. Porcentaje de lecturas con el 30 y 15% de poly–A o poly–T.....29
Tabla IV. Prevalencia de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis* de dos esteros de Nayarit.....35
Tabla V. Prevalencia e intensidad de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis* de Boca de Camichín 44
Tabla VI. Prevalencia e intensidad de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis* de Pozo Chino.....46
Tabla VII. Sitios nucleotídicos polimórficos identificados en el ITS de *P. marinus*.....49
Tabla VIII. Sitios nucleotídicos polimórficos identificados en la región NTS de *P. marinus* 50
Tabla IX. Diversidad nucleotídica del ITS y NTS de *P. marinus*.....55
Tabla X. Conteo de *P. marinus* incubado 4 días en FMT.....56
Tabla XI. Prevalencia e intensidad de *P. marinus* en *C. corteziensis* de BCS.....61
Tabla XII. Evaluación de la integridad del ARN para secuenciación RNA–Seq.....64
Tabla XIII. Tamaño de los fragmentos de las dos librerías de ARN.....65
Tabla XIV. Número de lecturas paired–end obtenidas de la secuenciación RNA–seq.....66
Tabla XV. Secuencias sobre representadas.....73
Tabla XVI. Número de *contigs* ensamblados con CLC.....73
Tabla XVII. Número de genes con Z–score < 1 77
Tabla XVIII. Características de los iniciadores para ACT–β de *C. corteziensis*.....81
Tabla XIX. Número de genes con expresión diferencial (Z–score > 1.5).....83
Tabla XX. Genes de respuesta inmune de *C. corteziensis* de Nayarit con infección uno….89
Tabla XXI. Genes de respuesta inmune en *C. corteziensis* de Nayarit con infección cuatro 90
Tabla XXII. Genes de respuesta inmune en *C. corteziensis* de BCS con infección dos.....91
Tabla XXIII. Genes de respuesta inmune en *C. corteziensis* de BCS con infección tres.....92
Tabla XXIV. Genes de respuesta inmune sobre–expresados en *C. corteziensis* experimentales con infección nivel tres.....93
Tabla XXIV. Genes de respuesta inmune sobre–expresados en *C. corteziensis* experimentales con infección nivel tres.....93
Tabla XXV. Genes de respuesta inmune sobre–expresados en *C. corteziensis* experimentales con infección nivel cinco.....94
Tabla XXVI. BlastX hits de los genes de *C. corteziensis* y eficiencias de las curvas estándares de qPCR.....101

1 INTRODUCCIÓN

La acuacultura se ha venido expandiendo de manera sostenida tanto en términos de producción total como por rango de especies cultivadas a nivel global. Con una tasa de crecimiento anual promedio del 10%, es por ahora el sector de mayor crecimiento económico en el renglón de producción de alimentos. Sin embargo, las enfermedades continúan causando significantes perdidas económicas a la producción acuícola internacional.

Recientemente ha sido planteada la hipótesis que las enfermedades en los océanos están aumentando, resultado probable del incremento en actividades antropogénicas, que además de causar mortalidades en el hospedero conllevan a posibles modificaciones estructurales de comunidades (Ward y Lafferty, 2004). Por otro lado, el aumento en el comercio internacional de productos marinos ha causado un incremento en la manifestación de enfermedades causadas por patógenos exóticos sin precedentes.

La teoría de la enfermedad sugiere que los patógenos y sus hospederos evolucionan paralelamente hacia una coexistencia, y los impactos de patógenos nativos sobre hospederos nativos son relativamente bajos. Cuando una nueva combinación de hospedero y patógeno ocurre, el hospedero puede mostrar una resistencia innata dada por rasgos fisiológicos a los que el patógeno nunca se había encontrado o por el contrario, podría mostrar una alta susceptibilidad al ataque del patógeno, debido a que nunca ha ocurrido una selección por resistencia.

Los moluscos hasta ahora han mostrado un patrón similar a otras especies marinas, en particular, se ha manifestado un incremento en la incidencia de brotes de enfermedades y la aparición de algunas enfermedades completamente nuevas “emergentes” (Harvell et al., 2002). Las nuevas herramientas de genómica funcional y el uso de los marcadores moleculares usados para el diagnóstico, han abierto una nueva perspectiva para los esfuerzos que se hacen en la actualidad para describir y explicar nuevas asociaciones de patógeno-hospedero.

El conocimiento generado de la enfermedad en *C. corteziensis* aportará información para llevar a cabo planes de manejo de la especie. La búsqueda de mecanismos a nivel global

otorgará una visión de los procesos de respuesta inmune a nivel transcripcional que la especie esta realizando ante la infección por *P. marinus,* para conducir el estudio en la búsqueda de genes que participan en la resistencia ante el protozoario.

2 ANTECEDENTES

La perkinsosis es una enfermedad que afecta a moluscos bivalvos. Los primeros signos de esta enfermedad fueron detectados en 1948 en *Crassostrea virginica* de la costa de Louisiana, EUA. *Perkinsus marinus* el agente causal, posteriormente fue detectado en ostiones a lo largo de la costa este de Estados Unidos hasta Tabasco en el Golfo de México (Aguirre-Macedo et al., 2007), alcanzando prevalencias del 70% en Laguna de Términos (Gullian-Klanian et al., 2008). En el 2006 el protozoario fue registrado en *C. corteziensis* de la costa de Nayarit, Noroeste de México con prevalencias máximas de 6% (Cáceres-Martínez et al., 2008), aumentado a 13% en el 2009 (CESANAY, 2010). Posteriormente *P. marinus* fue reportado en *Crassostrea gigas* en Sonora, México durante julio y agosto del 2006 (Enríquez-Espinoza et al., 2010).

Las especies de *Perkinsus* que han sido reconocidas son: *P. marinus, P. olseni, P. chesapeaki, P. mediterraneus, P. qugwadi* , *P. honshuensis* y *P. beihaiensis*. Entre sus principales hospederos se encuentran: ostiones, abulones, almejas, ostras perleras y mejillones. De la familia Perkinsidae, *P. olseni* y *P. marinus* son las especies que causan mortalidades masivas, que conllevan a pérdidas económicas (Moss et al., 2008; Villalba et al., 2004). Ambas especies son reguladas en moluscos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2011).

2.1 Morfología de *Perkinsus* sp.

El tamaño promedio de *P. marinus* es de 5 a 20 μm variando según la etapa de desarrollo. El menor tamaño se presenta en etapa de trofozoito, y el mayor diámetro lo alcanza en la etapa de esquizonte. Su morfología es en forma esférica, y bajo microscopio se distingue por tener forma de anillo. Es un organismo que está protegido por una pared celular, y en el citoplasma se encuentran numerosas vesículas, gotas lipídicas, el retículo endoplásmico, la mitocondria, una prominente vacuola que ocupa la mayor parte de la célula, el núcleo y el nucléolo que generalmente están desplazados hacia un extremo de la célula. En la etapa de zoosporas, el protozoario desarrolla dos flagelos laterales que favorecen la movilidad en

etapa de vida libre, características que lo clasifican en el phylum alveolata.

2.2 Ciclo de vida de *Perkinsus* sp.

Cuando el desarrollo se lleva a cabo dentro del hospedero, se le denomina proliferación vegetativa. La reproducción en este organismo se lleva a cabo por división binaria, dentro de la célula madre ocurre la multiplicación desarrollando hasta 32 células hijas que forman una roseta denominada esquizonte, la liberación de las células hijas ocurre cuando se forma un tubo de descarga en la pared de la célula madre. Posterior al desprendimiento del esquizonte, las células liberadas se convierten en trofozoitos inmaduros hasta desarrollarse como trofozoitos maduros capaces de reproducirse. Sin embargo, en esta especie se ha observado que no siempre se forma el esquizonte, lo que conlleva a la formación de dos trofozoitos inmaduros al momento de la bipartición. En etapa de vida libre, los trofozoitos maduros son considerados en estado de dormancia porque pueden sobrevivir largos periodos en vida libre, posteriormente dentro de la célula madre se desarrollan las zoozporas que son liberadas al medio ambiente cuando las condiciones ambientales son las favorables. Al momento de ser liberadas al agua, las zoozporas que desarrollaron dos flagelos inician el nado hacia los hospederos (Sunila et al., 2001).

La transmisión del protozoario es directa, a diferencia de otros protozoarios como *Plasmodium* sp. que necesitan un hospedero intermedio para proliferar. Las células de *Perkinsus* pueden ser transmitidas durante todo el año en las heces de los hospederos (Park et al., 2010), sin embargo, la proliferación es mayor cuando ocurre la mortalidad de los hospederos y el tejido se descompone. La mayor mortalidad de los hospederos ocurre durante y después de los máximos de temperaturas (28–30°C), que se relacionan con la máxima proliferación de células de *P. marinus* en la columna de agua (Ragone Calvo et al., 2003).

2.3 Técnicas de diagnóstico para *Perkinsus* sp.

La técnica tradicional de detección de *Perkinsus* sp. es mediante la incubación del tejido en

medio fluido de tioglicolato (FMT). Esta técnica consiste en el alargamiento de los trofozoitos de cualquier especie de *Perkinsus* (Ray, 1963), sin embargo, no es especie–específica y únicamente se puede detectar el protozoario en etapa de trofozoito. Para distinguir entre especies de *Perkinsus*, se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores especie–específicos, como los diseñados para *P. marinus* que amplifican la región de espaciadores no transcritos (NTS). Esta región no codificante se encuentran antes y después de la región que codifica a los genes 18S, 5S y 28S del ADNr. La técnica permite detectar al protozoario en cualquier etapa, y puede realizarse en hemolinfa para no sacrificar al organismo (Faveri et al., 2009; Marsh et al., 1995; Robledo et al., 1999), sin embargo, antes de elaborar iniciadores específicos es necesario genotipificar el aislado para que el diagnóstico sea específico. Las secuencias obtenidas con los iniciadores NTS para *P. marinus* en el ostión *C. corteziensis* presentan seis variaciones nucleotídicas (Cáceres-Martínez et al., 2008), lo que indica que hay polimorfismo respecto al genotipo de Texas, con el cual fue analizada su similitud, y surge la incertidumbre del origen del aislado que se presenta en los ostiones del Noroeste de México.

2.4 Variabilidad intraespecífica de *P. marinus*

De la familia Perkinsidae, *P. marinus* presenta el mayor polimorfismo nucleotídico en la región de espaciadores internos transcritos (ITS) del ADNr, presentando transiciones, tranversiones y en algunos aislados inserciones de 4 nucleótidos, generando controversias en la clasificación con *P. olseni* que se encuentra en el clado hermano con *P. marinus* (Brown et al., 2004).

Los métodos de diagnóstico molecular actuales han sido desarrollados para *P. marinus* del Atlántico, sin embargo, el genotipo gen del Pacífico pudiera presentar variabilidad debido al aislamiento geográfico con los genotipos del Atlántico. Para evaluar la variabilidad genética entre genotipos, se utiliza la técnica de PCR amplificando los ITS del ADNr que se encuentran entre las regiones que codifican los genes 18S, 5S y 28S del ADNr (Brown et

al., 2004), esta región es más variable respecto al 5.8S. Sin embargo, la región NTS tiene mayor polimorfismo y permite analizar la variabilidad intraespecífica para hacer inferencias filogenéticas.

2.4.1 Genotipos de *P. marinus*

Desde las costas de Nueva Jersey, Estados Unidos hasta las costa sur en Texas, se han identificado al menos 12 genotipos de *P. marinus*. En la zona norte que comprende Massachusetts, Connecticut, Rhode Island, Nueva Jersey y Maryland se han identificado los genotipos 1, 2, 3, 5, 6, 7, y 12. En Virginia, Carolina del Norte, Carolina del Sur, Georgia y Florida (costa este), que componen la zona sureste; se han identificado los genotipos: 1, 3, 8, 9, 10 y 11, y en la zona del Golfo de México integrada por Florida (costa oeste), Louisina y Texas, se han identificado los genotipos 3, 4, 9 y 12. La mayoría de los genotipos se distribuyen en varias zonas, sin embargo, hay genotipos como el genotipo 1, que únicamente se encuentra en la zona norte, el genotipo 8 es específico de Virginia, y el genotipo 4 del Golfo de México (Reece et al., 2001).

En estudios previos se han demostrado diferencias en la virulencia entre genotipos, obteniendo que el genotipo de Virginia es el más virulento, seguido del genotipo de Nueva Jersey clasificado como moderadamente virulento, y los genotipos de Louisina y Texas son considerados menos virulentos (Bushek y Allen, 1996).

2.5 Aspectos generales de *Crassostrea* sp.

El género *Crassostrea* pertenece a los moluscos bivalvos, estos organismos están cubiertos por una concha conformada por dos valvas que son manipuladas por el músculo aductor interno. Son organismos que se alimentan del material en suspensión que obtienen del filtrado de agua que pasa a través de un par de branquias filamentosas cubiertas por mucus. Transportan partículas entre 1 y 10 µm hacia los palpos labiales en donde el material no seleccionado se desecha en forma pseudo–heces, y el material seleccionado es consumido (Ward et al., 1994). La tasa de filtración de los ostiones llega a ser hasta de 1 l/h por gramo

de tejido (Haven y Morales-Alamo, 1970) variando según la concentración de partículas disueltas y dependiendo de las condiciones ambientales. Debido a la alta tasa de filtración que realizan los ostiones, pueden acumulan virus y bacterias en concentraciones más elevadas a las presentes a su alrededor (Nappier et al., 2008).

Los bivalvos cuentan con un sistema circulatorio abierto constituido por el corazón, arterias, y venas que conducen la hemolinfa a todos los tejidos. La hemolinfa es bombeada del corazón a las arterias que bifurcan en senos que irrigan la hemolinfa a todos los tejidos. La hemolinfa está constituida por células circulantes denominados hemocitos, que de manera general se han clasificado en hialinocitos por su bajo contenido de gránulos, y en granulocitos debido su alto contenido de gránulos constituidos por lisozimas y especies reactivas de oxígeno (ROS) que participan en la fagocitosis. Los hemocitos participan en el transporte de nutrientes, reparación y formación de la concha, y en el sistema inmune del organismo (Bachère et al., 2004).

2.6 Sistema inmune de ostiones

2.6.1. Respuesta inmune celular ante *Perkinsus* sp.

En general en bivalvos la primera reacción cuando entra un patógeno, es la activación de los hemocitos por quimotaxinas como la interleucina–8 (IL–8) de *M. galloprovincialis* (Ottaviani et al., 2000). Específicamente para *Perkinsus* sp. se ha observado que el contenido de β–1–3 glucan de la pared celular es reconocido por el hospedero mediante lectinas que se unen a carbohidratos, como la lectina MCL (*Manila clam lectin*) de *Ruditapes philippinarum* sintetizada bajo infecciones con *P. olseni,* esta lectina actúa como oposonina estimulando la fagocitosis. Adicionalmente se ha encontrado sobre–regulado el gen de la proteína *ß–galactosidase binding–lectin* en *C. virginica* infectado por *P. marinus* (Tanguy et al., 2004), y en *R. philippinarum* infectada con *P. olseni* se obtuvo la expresión de 7 lectinas, que participan en el sistema inmune como aglutinas y oposoninas (Kang et al., 2006).

Posterior al reconocimiento, el patógeno es internalizado formando dentro del hemocito el fagosoma fusionado con los gránulos lisosomales constituidos por hidrolasas como la *cv1*lisozima de *C. virginica* y especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden destruir al patógeno (Itoh et al., 2007). Sin embargo, en especies como *R. philippinarum* y *R. decussatus* el porcentaje de trofozoitos de *Perkinsus* fagocitados es únicamente del 11 y 36% respectivamente (Montes et al., 1995). La supervivencia de *P. olseni* y *P. marinus* a la fagocitosis se debe a la estrategia de defensa que el protozoario utiliza para catalizar la conversión de ROS a especies menos dañinas como la enzima superoxido dismutasa, lo cual sugiere que otros mecanismos intervienen en la destrucción del patógeno.

2.6.2 Respuesta inmune humoral

La interacción entre β–*glucan binding protein* (BGBP) con los β–1–3 glucanos de *Perkinsus* sp. forman un complejo que se une a los receptores de membrana en los hemocitos, desencadenando la liberación de una serie de moléculas inmuno reguladoras, surgiendo la modulación de genes inmunológicos específicos. La exocitosis del material granular promueve la liberación de lisozimas, ROS y moléculas del sistema Fenol–oxidasas (PO), ocurriendo una posterior activación de este sistema por los mismos β–1–3glucanos.
En *C. gigas* inoculado con *P. marinus* se ha reportado la sobreexpresión del BGBP, sugiriendo que la activación de la cascada proPO que produce fenoles, quinonas y melanina que son tóxicos para los patógenos, le confiere resistencia al hospedero ante la infección de *P. marinus* (Tanguy et al., 2004), a diferencia de lo que ocurre en *C. virginica* en donde la actividad de la fenoloxidasa no es activada por *P. marinus* (Jordan y Deaton, 2005). Otros autores mencionan que *C. gigas* a diferencia de *C. virginica,* tiene la capacidad de incrementar los inhibidores de serin proteasas (Xue et al., 2006) que le confiere resistencia a la infección del parásito porque neutraliza las proteasas perkinsin y subtilsin secretadas por *P. marinus* (Romestand et al., 2002). Recientemente se encontró que la expresión del inhibidor de serin proteasas *CvSI–1* es mayor en ostiones *C. virginica* resistentes a *P. marinus* que en ostiones susceptibles a la infección. Adicionalmente se ha obtenido *in vitro*

que la proliferación del protozoario es inhibida por la proteasa *CvSI–1* purificada del plasma de *C. virginica* (La Peyre et al., 2010).

2.7 Efectos de *Perkinsus* en el hospedero

Las especies que son susceptibles a la perkinsosis presentan disminución en la motilidad de los hemocitos, en la actividad lisosomal, y en el título hemaglutinante de hemocitos (Garreis et al., 1996). Adicionalmente, la invasión en el organismo genera afecciones en el tejido conectivo, puede producir atrofia en los túbulos digestivos, reducir el crecimiento y la reproducción del organismo (Chu et al., 2003; Villalba et al., 2004). En los casos extremos de infección como en el caso de *C. virginica,* causa mortalidades hasta del 80% en organismos de cultivo.

Aunque la enfermedad se presenta en moluscos, la respuesta de cada especie es diferente, lo que conlleva a que existan especies resistentes o susceptibles a la perkinsosis. Debido a la reciente aparición de *P. marinus* en el Noroeste de México, se propone investigar la respuesta inmune ante esta enfermedad en *C. corteziensis*, especie endémica que se ha propuesto como alternativa al cultivo de la especie introducida *C. gigas,* que en los últimos años ha presentado mortalidades inexplicables que conllevan al decremento de la producción.

3 JUSTIFICACIÓN

La aparición de nuevos patógenos como *P. marinus* en un nuevo hospedero, hacen necesario conocer el origen del protozoario para inferir la virulencia del genotipo por conocimiento previo. La caracterización molecular de *P. marinus* de diferentes localidades geográficas, contribuyen al entendimiento de la epidemiología del protozoario. La cercana relación filogenética entre el género *Perkinsus* conllevan a generar conocimiento con distintos marcadores moleculares para diferenciar entre especies e identificar si hay otras especies de *Perkinsus* en el área. Si el patógeno fue introducido por movimientos de moluscos del Atlántico, otras especies de *Perkinsus* pudieran estar en cohabitación.

Es necesario evaluar la condición de la enfermedad en los sitios de cultivo, y en los sitios de crecimiento natural de la especie, ya que estos organismos son los que repueblan el sitio y producen semilla que es capturada para ser cultivada en sitios aledaños. Es necesario el monitoreo continuo de la perkinsosis que es una enfermedad de declaración obligatoria ante la OIE para establecer medidas de manejo acorde a la situación de la enfermedad. El registro de este patógeno en un nuevo hospedero conlleva a conocer si *C. corteziensis* es un hospedero para el patógeno o únicamente es un vector. En caso de ser un hospedero se requiere obtener información sobre las consecuencias que causa en la especie, investigando cuales son los tejidos que afecta, que tallas son las más susceptibles, que sexo y estadío son los más susceptibles, y evaluar si las variables ambientales influyen en la proliferación de *P. marinus*.

La resistencia ante *Perkinsus* ha sido documentada en ciertas familias génicas, lo que conlleva a conocer la resistencia ante esta enfermedad. Diferentes mecanismos en *C. virginica* y en *C. gigas* han sido descritos como factores que participan ante la infección por *Perkinsus*, sin embargo, en *C. corteziensis* se desconoce. Siendo necesario la generación transcripcional comparando condiciones de infección contrastantes para obtener la expresión diferencial que permita darnos un panorama global de los procesos que *C. corteziensis* realiza ante *P. marinus*. El uso de herramientas globales como microarreglos son de gran ayuda para entender de manera general lo que está sucediendo. Para el caso en

particular de la infección por *P. marinus,* se sabe que hay inhibidores de proteasas que impiden su proliferación, y se conoce que la internalización de *P. marinus* es una desventaja para *C. virginica.* Partiendo de esta información es necesario evaluar los genes previamente reportados como genes que participan en la respuesta inmune de ostiones, y ampliar el conocimiento de otros posibles genes que participan en esta respuesta.

La carencia de información transcriptomica de *C. corteziensis* conllevan a la generación de esta, siendo necesario el uso de las nuevas herramientas de secuenciación masiva que generan altas cantidades de información. Este estudio aportará conocimiento genómico de la especie para continuar con estudios enfocados en ciertos genes de interés.

4 OBJETIVO GENERAL

Identificar la relación filogenética del genotipo de *P. marinus* que hospeda en *C. corteziensis* de Nayarit con los genotipos del Atlántico, y conocer si solo un genotipo de *P. marinus* se distribuye en ostiones de dos esteros de Nayarit.

Identificar a nivel transcripcional los procesos de respuesta inmune de *C. corteziensis* infectado por *P. marinus* del Noroeste de México.

4.1 Objetivos particulares

- Evaluar el estado de la enfermedad causada por *P. marinus* en *C. corteziensis* de dos esteros de Nayarit.
- Identificar la relación filogenética del genotipo de *P. marinus* aislado de *C. corteziensis* cultivado en dos esteros de Nayarit con los genotipos del Atlántico.
- Conocer los mecanismos de respuesta inmune de *C. corteziensis* involucrados en la infección con *P. marinus.*
- Identificar si las diferencias en los niveles de expresión de genes que participan en la respuesta inmune de *C. corteziensis* se relacionan con la intensidad de la infección causada por *P. marinus.*

5 HIPÓTESIS

Si *P. marinus* es el protozoario que hospeda en *C. corteziensis* de Nayarit, se espera que el genotipo del Pacífico diverja genéticamente de los genotipos de *P. marinus* del Atlántico. Una alta similitud con ciertos genotipos del Atlántico, indicaría el origen de una posible introducción de *P. marinus* causada por movimientos de moluscos del Atlántico al Pacifico.

Debido a que no se han presentado mortalidades en *C. corteziensis* infectado con *P. marinus* se sugiere que *C. corteziensis* es tolerante a *P. marinus,* se espera que la respuesta inmune a nivel transcripcional este participando en la tolerancia al genotipo de *P. marinus* aislado del Noroeste de México.

6 METODOLOGÍA

6.1 Colecta de organismos

En julio del 2010 se colectaron 25 ostiones *C. corteziensis* (6.06 ± 0.87 cm de largo) del estero Boca de Camichín y 31 ostiones del estero Pozo Chino Nayarit, México (Fig. 1). Los organismos fueron trasladados vivos por el Comité de Sanidad Acuícola de Nayarit (CESANAY) al laboratorio de biología molecular de la Universidad Autónoma de Nayarit (UAN). Los ostiones fueron lavados de la concha, y fueron abiertos por la valva anterior para el muestreo de tejidos.

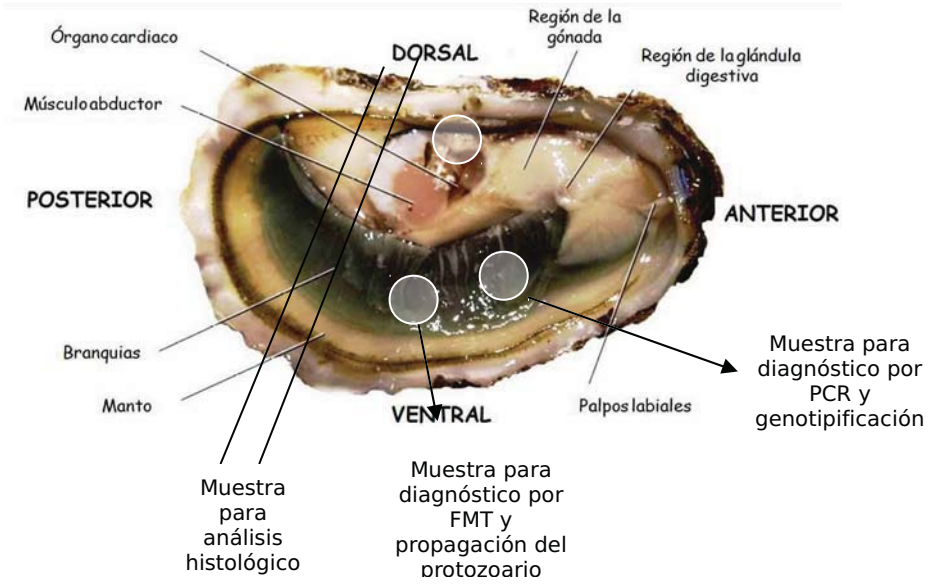


Fig. 1. Tejidos de *C. corteziensis* muestreados para el diagnóstico, genotipificación y propagación de *P. marinus.*

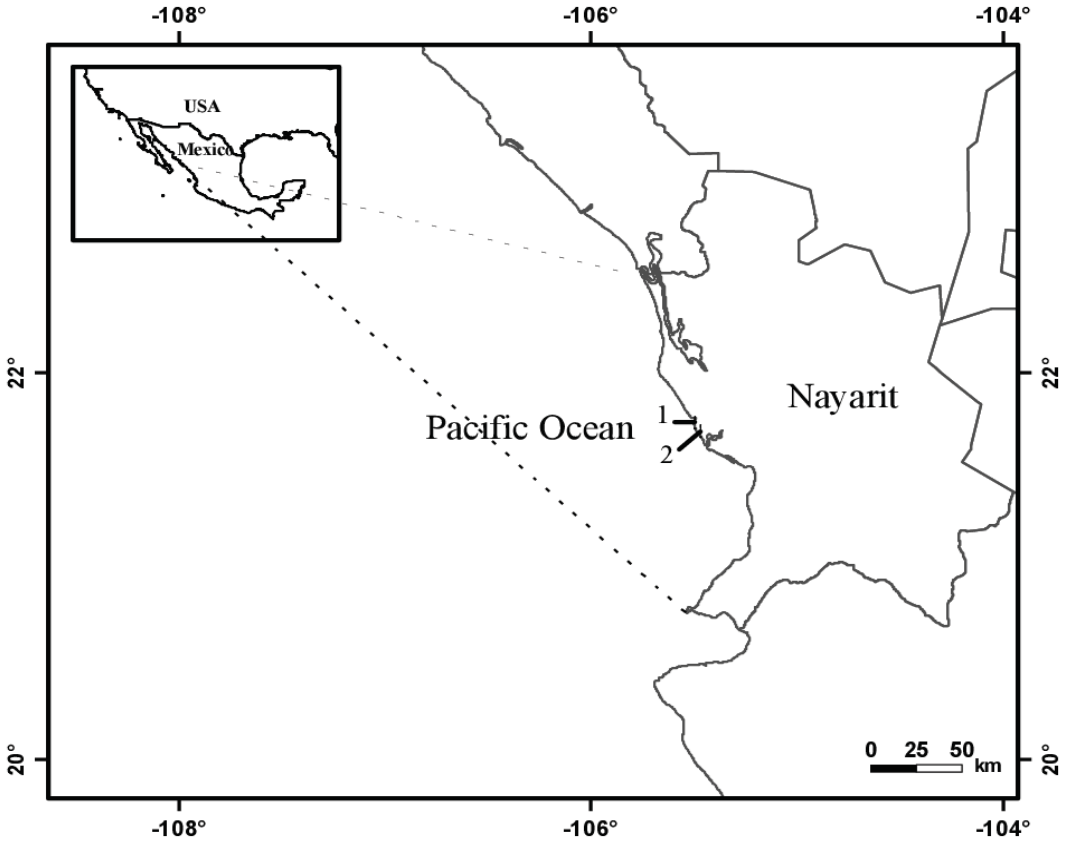


Fig. 2. Sitios de colectada de *C. corteziensis* del estero Boca de Camichín (1) y Pozo Chino (2) en Nayarit, México.

6.2 Prevalencia de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis*

6.2.1 Extracción de ADN

De cada organismo se fijaron 5 mg de branquias en etanol al 90% (Fig. 2). Entre 5 y 10 mg de tejido branquial fueron utilizados para extraer ADN con el kit de diagnóstico molecular (QIAamp DNA de Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN fue cuantificado a 260 nm mediante espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, Waltham, MA, EU), y se ajustó la concentración de ADN a 100 ng/µl.

6.2.2 Amplificación por PCR de la región ITS de *Perkinsus*

La detección de *P. marinus* se realizó mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 532 pb de la región ITS1, 5.8S e ITS2 de *Perkinsus.* La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl con 5 µl de amortiguador 5×, 2.5 mM de $MgCl_2$, 10.5 µg de BSA (Promega, R396E, Madison, WI, USA), 0.25 mM de dNTPs, 0.2 µM de los oligonucleótidos PerkITS1F 5´–GAG ATG GGA TCY CCG CTT TGT TT–3´ y PerkITS1R 5´–GAA TCG CGT GAT CRA GGA ACA CG–3´ (Park et al., 2006), 1 U de Go*Taq* Flexi ADN polimerasa (Promega, M295) y 100 ng de ADN genómico. Como control positivo se utilizó ADN de *P. olseni* y *P. chesapeaki* (538, 550 pb respectivamente) proporcionados por el Laboratorio de Referencia Europeo de Enfermedades de Moluscos de IFREMER, La Tremblade, Francia. Las amplificaciones se efectuaron en los termocicladores Peltier thermal cycler (PTC–100, MJ Research, Waltham, MA, EU) y Applied Biosystem (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, EU) con un paso de desnaturalización inicial a 95 ºC durante 4 min seguido de 40 ciclos (95ºC por 1 min, 65ºC por y 72ºC por 1 min), y la elongación se efectuó a 72ºC por 5 min. Los productos de PCR fueron corridos una hora en gel de agarosa al 1.2% diluido en amortiguador TAE 1X, teñidos con bromuro de etídio al 5% y visualizados bajo UV. La prevalencia de *P. marinus* en *C. corteziensis* se obtuvo con la siguiente fórmula Prevalencia = (No. de organismos infectados/No. de organismos analizados) ×100.

6.3 Evaluación de posibles coinfecciónes de *Perkinsus* sp.

6.3.1 Análisis de restricción enzimática

Los amplicones ITS (10 µl) fueron digeridos durante 2 hrs a 37°C en un volumen final de 20 µl con 0.25 U/µl de la enzima de restricción *Rsa*I o *Hinf*I (Abollo et al., 2006) y 2 µl de amortiguador 10× (Promega). Los patrones de restricción *in silico* fueron obtenidos con el programa Restriction Mapper 3.0 (http://www.restrictionmapper.org/). Los productos se corrieron en un gel al 2% de agarosa con bromuro de etídio y fueron visualizados después de 1 hr en UV comparando el patrón de digestión de *P. marinus* con los patrones de los fragmentos de *P. olseni* y *P. chesapeaki* (Tabla I).

Tabla I. Patrón de digestión con *Rsa*I y con *Hinf*I

Enzima	*P. marinus*	*P. olseni*	*P. chesapeaki*
*Rsa*I	204	259[b]	195
	195[a]	193	166
	74[a]	86	103
	56	–	86
*Hinf*I	368[a]	367	212[b]
	161[a]	171	151

[a] Fragmentos identificados en este estudio.
[b] Fragmentos que permiten diferenciar a *P. marinus* de otras especies.

A continuación se muestran los fragmentos que amplifican los oligonucleótidos propuestos por Park, 2006 para *P. marinus, P. olseni* y *P. chesapeaki*.

>EU919510 ***Perkinsus marinus*** isolate PXBICv25-B9-C5
ATTCACACCGATTCATTATCTGAGAAACCAGCGGTCTCGCTCTCTCTTGCTCTTTTGTTAGAGAGTTGC**G**
AGATGGGATCCCCGCTTTGTTTGGATCCCCCCACCTTAACTTGTTAAGGTGATTAATTCCTATGAACCAT
T*GTAC*TAGTCATAGTATCCAAATCCAATTTTGGATTTTGGTATTTCAAAACGAAATTCCAAACTCTCAAC
GATGGATGCCTCGGCTCGAGAATCGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAAGCACTGCGATTTGCAGAAT
TCCGTGAACCAGTAGAAATCTCAACGCATACTGCACAAAGGGGATCTTTCCTCTTTGTACATACATATCA
GTGTCGCTCTTCTTCCCGATACAAACATTTTGTTGTTAACGCAACTCAATGCTTTGTATCCCGCTTGAAC
TAACTCTTCGGAGGTGGTTCGTTATGTGCGCTTGTGAAGGCAGGCGTATTAATTTGCAAGGCTATAATCT
CGTATTGTAGCCCCTCCGAAAGGAGCTTGCGCCTGTGAGTATCTCTCGAGGTACTCGCAAACTCGACTGT
GTTGTGGTGATATCA**CGTGTTCCTTGATCACGCGATTC**TTCTCTTCAACGCATTACGTCAAATCTATTGA
TAAATGCAGAGAAGTGTTTGAATCACGCGTTCAGTCTGGTCGCGAGATTATTATATATCATAACACGCTT
GTCGGTTTGCACCATGGCAATATGTCATCATTAGAAGGCCTGATGTGTGTGAGATT
Total 529 pb

>DQ516715 ***Perkinsus olseni*** isolate Mie13v_9
ATTCACACCGATTCATTCTCTGCGAAACTAGCAGTCTTGCTTCGGC**GAGATGGGATCCCCGCTTTGTTT**G
GATCCCCCCACCTGACCGCCTTAACGGGCCGTGTTAGGTGATTATCTCCTATGAACCATT*GTAC*TAGTCA
CAGTATCCAAATCCTTTTGGATTTTGGTATTTCAAAACGAAATTCCAAACTCTCAACGATGGATGCCTCG
GCTCGAGAATCGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAAGCACTGCGATTTGCAGAATTCCGTGAACCAGT
AGAAATCTCAACGCATACTGCACAAAGGGGATCTTTCCTCTTT*GTAC*ATACATATCAGTGTCGCTCTTCT
TCCCGATACAAACATTTTGTTGTTAACGCAACTCAGTGCTTTGTATCCCGCTTGGACTAACTCTTCGGAG
ATAGTTCGTTATGTGCGCTTGTGAAGGCAGGCGTATTAATTTGCAAGGCTATAATCTCGTATTGTAGCCC
CTCCGAGAGGAGGACCGCGCCTGTGAGTGTCTTTGGATGCTCGCAAGTCCGACTGTGTTGTGGTGATATC
A**CGTGTTCCTTGATCACGCGATTC**TTCTCTTCAACGCATTATGTCAATTCTTGATGAAATGCAGAGAAGT
GTTTGGATCACGCGTTCAGTCTGGTCGCGAGATAGCTATATATCATAGCACGCTTGTCGGTTTGCACCAT
GGCAAATTGTCATCATTAGAAGGCCTGATGTGTGTGAGATT
Total 538 pb

>EU919500 ***Perkinsus chesapeaki*** isolate YRKCMb1-G2-G8
ATTCACACCGATTCATTCTCTGAGAAACCAGCGGTCTCTGTAAAAG**GAGATGGGATCTCCGCTTTGTTT**A
GATCCCCACACCTGACCGCTTTAACCGGCTGGGTAGGTGCATAACTTCTATGAACCAATT*GTAC*TAGTCT
AAAGTATCCAATATCCTTTTGGATTTTGGTATTTCAAAACGAAATTCCAAACTCTCAACGATGGATGCCT
CGGCTCGAGAATCGATGAAGGACGCAGCGAAGTGCGATAAGCACTGCGATTTGCAGAATTCCGTGAACCA
GTAGAAATCTCAACGCATACTGCACAAAGGGGATTTATCCTCTTT*GTAC*ATACATATCAGTGTCGCTCTT
CTTCCCGATACAAACATTTTGTTGGTTTTAAATCAACTCTATGCTTTGTATCCCGCTTGAATTCCGATTT
ATTGGAATTCGCTGTGTGCGCTTGCTAACACAGGCGCATTAATTTGCAAGGCTATAATACTACTTTAAGT
A*GTAC*TGTAGCCCCTTCGCAAGAAGGACTGCGCTAGTGAGTATCTTTGGATACTCGCGAACTCGACTGTG
TTGTGGTTGATTC**CGTGTTCCTTGATCACGTGATTC**ATCGCTTCAACGCATTATGTCAATCTTGATGAAT
GCAGAGAAGTTGTTTATGAGTCTCGCGGTCGCTTTGGTCTCAGAATCGTTACTATAACACGCTTGTAGGT
TTGCACCATTGGCGATATGTCATCATTAGAAGGCCTGATGTGTGTGAGATT
Total 550pb

6.4 Análisis filogenético de *P. marinus*

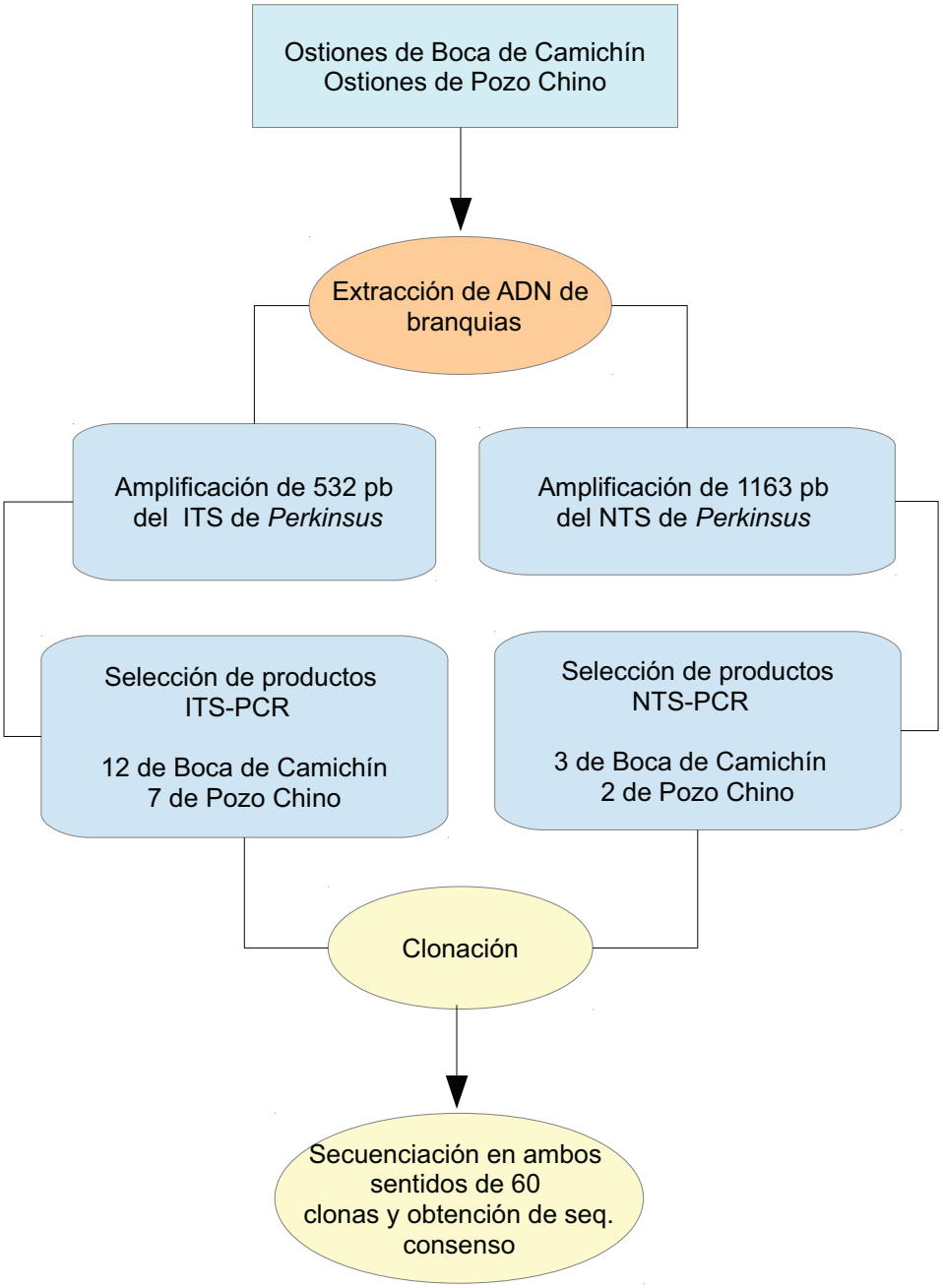


Fig. 3. Diagrama de flujo para obtener las secuencias de *P. marinus*.

6.4.1 Amplificación de la región NTS

A partir del ADN de branquias de tres ostiones de Boca de Camichín y dos ostiones de Pozo Chino, se amplificaron 1,140 pb de la región NTS. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 µl con 10 µl de Go*Taq* Master Mix (Promega), 1 µM de los oligonucleótidos PKnts FW 5′–AAG TCC TTA GGG TGC TGC TGG CT–3′ y PKnts RV 5′–ACT ACT GGC AGG ATC AAC CAG GT–3′ (Park et al., 2005). La amplificación se realizó con un paso de desnaturalización a 95ºC durante 4 min, seguido de 30 ciclos (94ºC por 1 min, 57ºC por 1 min y 70ºC por 1 min), y elongando a 70ºC por 5 min. Los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa al 1.2% diluido en amortiguador TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio al 5%, y visualizados bajo UV.

6.4.2 Clonación y secuenciación de las regiones ITS y NTS

Los ITS amplificados de diez ostiones de Boca de Camichín y siete ostiones de Pozo Chíno, así como los productos NTS de tres ostiones de Boca de Camichín y dos ostiones de Pozo Chino fueron ligados al vector pCR2.1 Topo TA(Invitrogen, Carsbad, CA, EU), la mezcla de ligación fue preparada con 1 µl de amortiguador 10X, 2 µl de vector, 1 µl de ligasa, 5 µl de agua y 1 µl del producto de PCR. La mezcla fue incubada 12 hrs a 14ºC y posteriormente se mantuvo a -20ºC hasta su clonación. A cada tubo con células químicamente competentes del kit antes mencionada se le adicionaron 20 µl del producto ligado, se mantuvieron en hielo durante 30 min y se incubaron a 42ºC por 20 seg seguidos de 5 min en hielo, al mismo tubo se le incorporaron 250 µl de medio SOC y fueron incubados durante 1 hr a 37ºC. Del producto anterior se incorporaron 40 µl a placas con medio LB con ampicilina y 60 µl de XGal (20 mg/µl). Se dejaron incubando toda la noche a 37ºC.

De cada placa se tomaron 10 colonias blancas con inserto y se incorporaron a una nueva placa con LB–agar. El ADN plasmídico fue extraído con el kit Spin miniprep (QIAprep, Qiagen). Todas las colonias fueron verificadas mediante PCR y visualizadas en gel de agarosa al 1.2%. Al menos tres clonas de cada producto de PCR fueron enviadas a la

Universidad de Valencia, España para su secuenciación bidireccional utilizando los oligonucleótidos universales SP6 y T7.

6.4.3 Análisis bioinformático de las secuencias ITS y NTS

Los cromatogramas de las secuencias fueron convertidos de formato ABI a formato FASTA y las secuencias con baja calidad fueron eliminadas con el programa Phred (Ewing et al. 1998; Ewing y Green 1998). La eliminación del vector fue realizada con el script SeqClean (http://seqclean.sourceforge.net/) utilizando la base de datos UniVec (NCBI). Los sitios polimórficos de las secuencias consenso fueron visualmente verificadas en los cromatogramas utilizando el programa 4Peaks (http://nucleobytes.com). Las secuencias de cada región fueron alineadas mediante software CLUSTAL W y la diversidad nucleotídica fue calculada con el programa DNAsp 5 (Librado y Rozas 2009). Las distancias filogenéticas fueron calculadas con el programa MEGA 5, utilizando los modelos previamente calculados Kimura–2–Parameter (K2) para la región ITS y Tamura–3–Parameter (T92) para la región NTS (Tamura et al. 2011). La robustes de los árboles de neighbour–joining fueron analizados con 10,000 repeticiones bootstrap, y los árboles de parsimonia fueron generados con 1000 repeticiones. La confirmación de la identidad de los marcadores de ADNr de *Perkinsus* fueron realizadas mediante búsquedas en la base de datos BLAST (Altschul et al. 1997). Las secuencias obtenidas fueron incorporadas a la base de datos de GenBank utilizando el programa Sequin del NCBI.

6.5 Análisis de intensidad de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis*

6.5.1 Incubación en FMT de branquias y sistema digestivo de *C. corteziensis*

Una porción de branquias y sistema digestivo de 54 ostiones de Boca de Camichín y 47 ostiones procedentes de Pozo Chino Nayarit, México (Fig. 1) fue incorporado en tubos con nueve mililitros de medio fluido de tioglicolato (FMT) (1L de agua de mar estéril, 29.4 g de FMT sin agar, pH 7) (225650, Difco) y un mililitro de la solución de antibióticos (100

U/ml de penicilina G, 100 U/ml de estreptomicina y 50 U/ml de nistatina) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, P4333 y N3503). Los cultivos fueron mantenidos en oscuridad durante cuatro días a 25ºC y posteriormente los tejidos fueron colocados en un portaobjetos para ser teñidos con unas gotas de lugol, después de 10 min las preparaciones fueron examinadas. El conteo de las células teñidas de azul o negro se realizó bajo microscopio utilizando el objetivo 10X (Ray, 1963). La intensidad de infección fue clasificada en categorías de acuerdo a la escala de Mackin basada en el conteo de esporas por objetivo ocular del microscopio (Quick, 1972).

6.5.2 Incubación en FMT del tejido completo de *C. corteziensis*

La intensidad de *Perkinsus* sp. en ostiones de Baja California Sur y en ostiones experimentales fue evaluada mediante la incubación por siete días del tejido completo en FMT (29.4 g/l de FMT, pH 7, 100 U/ml de penicilina G, 3.2 g/l de estreptomicina y 50 U/ml de nistatina) . Los tejidos se incubaron una hora a 50°C con 10 ml de NaOH (2N) y el botón celular fue recuperado mediante centrifugación a 2,500 rpm resuspendido en 5 ml de PBS. Se realizaron diluciones de 1:10, 1:100, 1:1000, de las cuales se mezclaron (1:1) con 15 µl de neutral red (Sigma–Aldrich, N2889) durante 30 min. La densidad del protozoario fue cuantificada a 20X bajo microscopio en las cuatro esquinas de la cámara de Neubauer. El densidad fue calculada mediante la fórmula: No. cel/ml = (C1 + C2 + C3 + C4)/4 × 10,000 × Fd, en donde C es el conteo de cada esquina y Fd es el factor de dilución. La intensidad de infección fue clasificada del 0–5 de acuerdo a la escala de Mackin (Quick, 1972) en donde la ausencia del protozoario es cero y la infección más alta es cinco.

6.6 Análisis histopatológico

6.6.1 Histología convencional

Una sección transversal del tejido de cada ostión de Nayarit fue disectada e incorporada a cassettes histológicos para ser fijadas durante 48 hrs en solución Davidson (400 ml de

glicerol, 800 ml de formaldehído, 1200 ml de agua de mar filtrada y 1200 ml de alcohol al 96%) seguidos de la deshidratación: alcohol 70% 12 hrs, alcohol 70% 1 hr, alcohol 80% 1 hr, alcohol 90% 1 hr, alcohol 90% 1 hr, alcohol 100% 1 hr, alcohol 100% 1 hr, alcohol 100% 1 hr, mezcla de etanol 50% y xilol 50% 20 min, xilol absoluto 10 min, posteriormente fueron incubados a 65ºC en xilol–parafina 15 min, seguidos de tres incubaciones de una hora en parafina. Los bloques incluidos en parafina fueron cortados a 4 µm utilizando el microtomo (Leica RM 2155) y posteriormente fueron incorporados en portaobjetos esmerilados. Los cortes de tejidos teñidos con hematoxilina–eosina fueron cubiertos con portaobjetos para ser visualizada bajo microscopio (Olympus BX41) la presencia o ausencia de *Perkinsus*. Los resultados fueron capturados a través de la cámara digital Cool–SNAP–Pro con el programa Image Pro Plus v 4.5.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EU).

6.6.1.1 Evaluación de la condición reproductiva

De cada organismo, se determinó el sexo (hembra o macho), y el estadio reproductivo se clasificó como: estadio cero a los organismos indiferenciados, estadio uno a los previtelogenicos, estadio dos a los vitelogenicos, estadío tres a los postvitelogenico y estadío cuatro a los organismos desovados. El índice de tejido gonádico ITG = área que ocupa la gónada/el área total × 100 (Rodríguez-Jaramillo et al. 2008) fue calculado a partir de tres imágenes a 4X.

6.6.2 Hibridación *in situ*

Se elaboró la sonda para organismos del género *Perkinsus* (Reece et al., 2008) con deoxinucleotidos acoplados a la dioxigenina (DIG–11–dUTP). Los cortes previamente desparafinados con xileno e hidratados con alcoholes y PBS, fueron incubados a 37ºC por 15 min con 10 µg/ml de proteinasa K. Se realizaron dos lavados con PBS, y los tejidos fueron hibridizados con 3 µl de sonda diluidos en 100 µl de solución de hibridación durante toda la noche a 42ºC en cámara húmeda. Se realizaron una serie de lavados con

PBS para eliminar restos de la sonda y se llevó a cabo el bloqueo e incorporación del anti–dioxigenina (1:500) durante una hora utilizando las soluciones del kit DIG DNA labeling and detection kit (Roche Molecular Biochemicals). Los cortes equilibrados con amortiguador Tris–HCL (pH 9) fueron teñidos con 3 µl de NBT/BCIP durante una hora, y contrateñidos con café biskmarck para observación bajo microscopio (Leica).

6.7 Propagación de *P. marinus*

A partir de 11 ostiones *C. corteziensis* de Boca de Camichín, Nayarit, se obtuvieron fragmentos de 1 cm^2 de branquias. Los tejidos depositados en placas de 24 pozos (Falcon, 353847) fueron enjuagados dos veces con 2 ml de agua de mar, seguido de dos lavados con 2 ml de antibiótico (100 U/ml penicilina G–estreptomicina, y 50 U/ml de nistatina) (Sigma–Aldrich, P4333 y N3503) durante 30 min, y un último lavado con agua de mar estéril. Los tejidos fueron macerados en un mililitro de antibiótico, y centrifugados a 12,000 g durante 5 min para eliminar el sobrenadante. El precipitado resuspendido en un mililitro de agua de mar estéril fue filtrado a través de una malla de 150 µm, y cuatro réplicas de 50 µl fueron incorporadas en las placas con 1 ml de medio DME–Ham's F12 (GIBCO, Carlsbad, CA, 12500–062,) preparado con: 50 mM de Hepes (Sigma–Aldrich, H7006), 3.5 mM de bicarbonato de sodio, medio DME y Ham's F12 en una relación 1:2 disuelto en agua de mar estéril, y ajustado a un pH entre 6.6–6.8. A la solución filtrada a través de 0.2 µm se le adicionó: 5% de suero fetal de bovino (F6178, Sigma–Aldrich) previamente activado a 56°C por 30 min, 100 U/ml de penicilina G y estreptomicina, y 50 U/ml de nistatina (Gauthier y Vasta, 1995).El cultivo se incubó a 28ºC en cámara húmeda, y se realizaron resiembras cada seis días. Posteriormente se recuperó el contenido de cada pozo y se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min, se descarta el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de agua isotónica.

El escalamiento fue realizado en frascos de cultivo de 50 ml con 25 ml medio DME–Ham's F12 (1:2) inoculado con el cultivo de las placas, se incubó durante 6–8 días y se cuantificó la densidad hasta obtener 10^5 cel/ml. El protozoario recuperado por centrifugación (2,000

rpm durante 15 min) fue enjuagado dos veces con agua de mar estéril (Gauthier y Vasta, 1995; Casas et al. 2002) y cuantificado como se describe en la sección 6.5.2.

La presencia de *Perkinsus* sp. en los ostiones utilizados para la propagación del protozoario fue analizada por PCR y mediante la incubación de una porción de las branquias en FMT siguiendo el protocolo antes mencionado en la sección 6.5.

6.8 Infección de *C. corteziensis* con *P. marinus*

A 65 ostiones *C. corteziensis* (n = 65) de 6–7.5 cm de longitud, cultivados en BCS, México se les realizó una muesca en la concha anterior cercana al músculo aductor y se les succionaron entre 250 y 500 ml de agua. A 26 ostiones mantenidos como grupo control, se les adicionaron 220 µl de agua de mar sintética, y a 39 ostiones se les inyectaron 5.4×10^6 (54,000,000) células de *P. marinus* contenidos en 220 µl de agua de mar. Una vez incorporados los 220 µl, el orificio fue cerrado con un par de ligas de plástico para impedir la apertura de los organismos. Después de 30 min, 13 ostiones fueron repartidos en cada tara y después de 24 hr se les retiró la liga y se les alimentó con la mitad de la ración diaria de *Isochrisis galbana*. A los siete días se les realizó el primer recambio del 10% de agua para retirar con una manguera las heces, y posteriormente se realizaron recambios del 10% cada tercer día. La temperatura del agua fue mantenida entre 26 y 27°C con calentadores sumergibles, y la mortalidad fue verificada diariamente. Debido que el 50% de los ostiones infectados murieron a los 14 días de inoculados, los organismos sobrevivientes fueron sacrificados para ser muestreados el día 15.

Una porción de branquias de cada organismo fue preservada en 500 µl de RNAlater para su posterior extracción de ARN (Ambion, AM7024). La prevalencia fue evaluada por PCR a partir de branquias como se describe en la sección 6.2.2. El resto del tejido fue pesado e incubado durante siete días en FMT para calcular la intensidad de la infección por *Perkinsus* siguiendo la metodología de la sección 6.5.2, los ostiones fueron clasificados por grupos de acuerdo al nivel de infección.

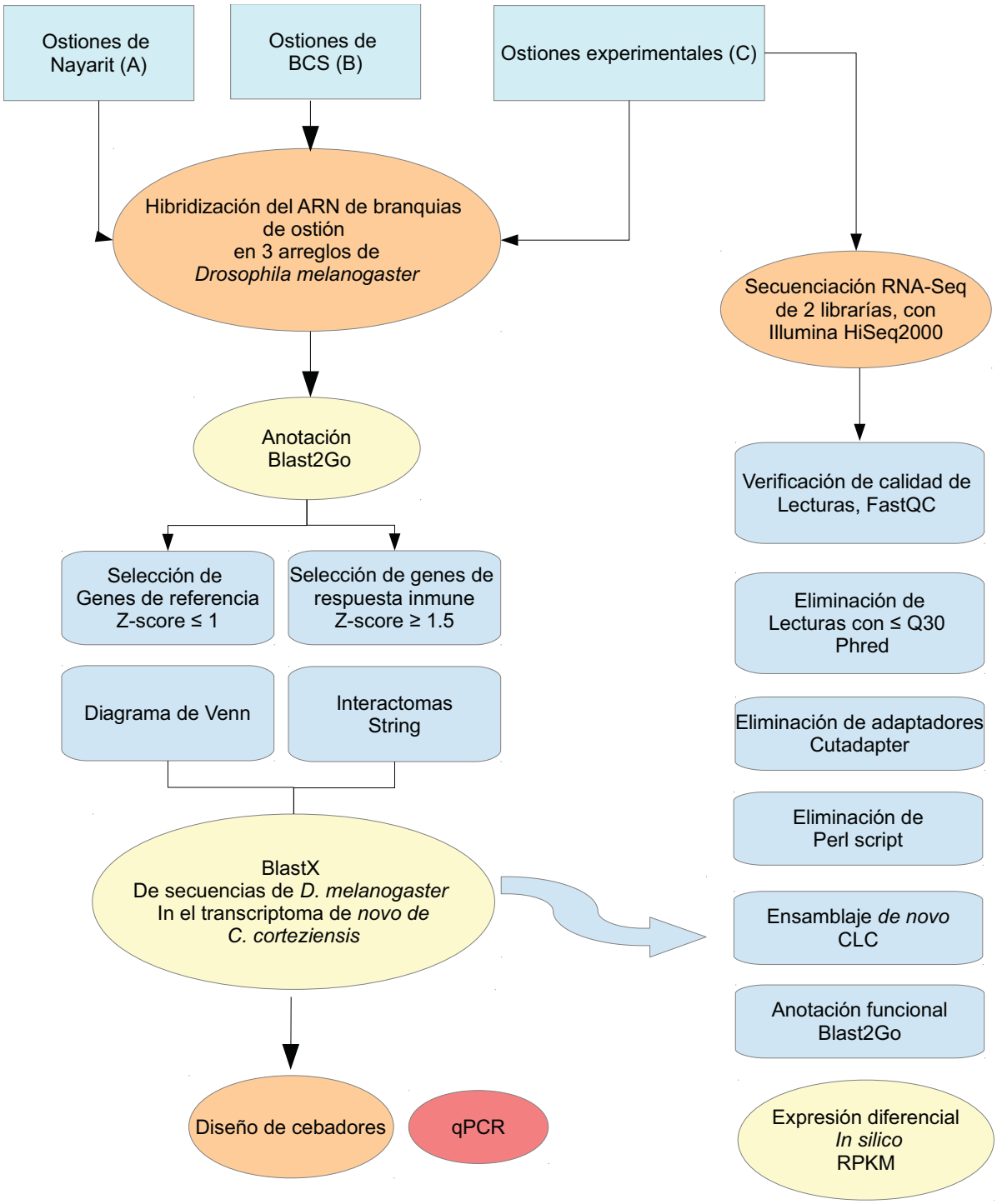


Fig. 4. Diagrama de flujo para la obtención de genes del sistema inmune de *C. corteziensis* en respuesta a la presencia de *P. marinus*.

6.9 Análisis de expresión génica

6.9.1 Extracción de ARN

A una porción de branquias homogeneizadas individualmente en 500 µl de Trizol (Life Technologies, Invitrogen, 15596–018), se le incorporaron 100 µl de cloroformo frío seguidos de agitación manual. Después de tres minutos de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm por 15 min y el sobrenadante (100 µl) fue incubado 15 min a temperatura ambiente con 250 µl de isopropanol. Los botones celulares obtenidos mediante centrifugación a 12,000 rpm, fueron enjuagados con 500 µl de etanol (70%) y centrifugados nuevamente a 12,000 rpm por 5 min. El botón celular fue resuspendido en 50 µl de agua DEPC y el ARN fue cuantificado en el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). La calidad del ARN fue verificada mediante electroforesis, incorporando 5 µl de ARN en gel de agarosa al 1.2% con bromuro de etidio, y visualizado bajo UV.

6.9.2 Secuenciación del transcriptoma de *C. corteziensis*

A partir de branquias de tres ostiones experimentales (04, 06 y 18) con el menor nivel de infección (nivel 3) por *P. marinus*, y de tres ostiones (24, 25 y 32) con el mayor nivel de infección (nivel 5), se extrajo ARN con el método mencionado en la sección anterior. Un paso adicional de limpieza fue realizado en 4 µg de ARN diluidos en 100 µl, incorporando un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1, pH 4–5) seguidos de una homogenización manual y centrifugados a 12,000 rpm durante 15 min. La parte superior fue recuperada y cuantificada en el Nanodrop 2000.

Del ARN (2 µg por individuo) de los primeros tres ostiones se formó la muestra 1C y del ARN de los tres ostiones mayormente infectados se conformó la muestra 2T. El ARN (6 µg) de cada muestra fue diluido en 60 µl y se les adicionó el 0.1% (6 µl) de acetato de sodio (3M, pH 7–8) y dos volúmenes (132 µl) de etanol absoluto. Las dos muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm y mantenidas a -20°C durante una noche.

Las dos muestras de ARN (1C y 2T) fueron enviadas a secuenciación a Macrogen Korea,

en donde se les evaluó la integridad con el bioanalizador Agilent 2100 utilizando el chip 6,000. Se construyeron dos librerías genómicas con oligo dT e incorporaron los adaptadores TruSeq Universal Adapter y TruSeq Adapter Index 8 a la librería 1C, y TruSeq Universal Adapter y TruSeq Adapter Index 9 a la librería 2T. El tamaño de los fragmentos de las librerías fue verificado por Macrogen con el bioanalizador Agilent 1000, obteniendo fragmentos de 405 y 432 pb para la muestra 1C y 2T respectivamente. Ambas librerías fueron secuenciadas en ambas direcciones con una distancia de 200 pb entre las terminaciones (paired–end) con el secuenciador Illumina HiSeq 2000. Posterior al análisis de las imágenes generadas por el secuenciador, se utilizó el programa Illumina pipeline de CASAVA v1.8.2 para convertir las bases (*.bcl) en formato fastq.gz, y realizar el conteo de lecturas por librería.

6.9.2.1 Verificación de la calidad de las lecturas generadas con RNA–Seq

De cada librería se obtuvieron dos archivos con formato fastq, los cuales fueron descargados del servidor de Macrogen con el comando wget en linux. Las lecturas incorporadas al programa FastQC v0.10.1 fueron cuantificadas, se les verificó el valor de calidad Phred (Q) de cada base con la fórmula $Q = -10\ \mathrm{Log}_{10}(P)$ donde P es la probabilidad de que la base sea errónea, se verificó el porcentaje de GC, el contenido de adenina, timina, guanina y citocina por posición nucleotídica, el tamaño de las lecturas, el contenido de bases ambiguas (N), y el porcentaje de lecturas y K–meros sobre representados.

6.9.2.2 Limpieza de lecturas

Los archivos con formato fastq fueron convertidos a fasta con el script fastq2fasta.pl utilizando el comando en Perl fq2fl.pl -a 1C_1.fastq. Mediante Phred y seqclean, se descartaron las lecturas con $Q > 30$ que indica que el error de cada base es de 1 en 1,000 pb, y se eliminó la primera base cuando se presentaba una base ambigua (N).

Cada adaptador fue cuantificado en los cuatro archivos de las dos librerías (Tabla II) y se realizó el conteo de poly–A y poly–T (Tabla III). Con el programa cutadapt v1.1.

(http://code.google.com/p/cutadapt/) corrido en Python, se realizó la limpieza de adaptadores, poly–A y poly–T siguiendo la recomendación de eliminar lecturas con el 33% del contenido de poly–A (Crawford et al. 2010).

Tabla II. Número de adaptadores por librería.

Nombre del adaptador	Número de adaptadores por librería			
	1C_1	1C_2	2T_1	2T_2
Adaptador 1	0	0	0	0
Adaptador 2	14322	0	3	0
Adaptador 3	0	0	0	0
Adaptador 4	0	0	8407	0

Los adaptadores utilizados para la librería1C fueron:

TruSeq Universal Adapter (1)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

TruSeq Adapter, Index 8 (2)

5’GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC<u>ACTTGA</u>ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG

Los adaptadores utilizados para la librería 2T fueron:

TruSeq Universal Adapter (3)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

TruSeq Adapter, Index 9 (4)

GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC<u>GATCAG</u>ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG

Tabla III. Porcentaje de lecturas con el 30 y 15% de poly–A o poly–T.

Contenido de poly–A o poly–T	Número y porcentaje de lecturas con poly–A o poly–T por librería				Total de lecturas
	1C_1	1C_2	2T_1	2T_2	
30 poly–A	3,909 (0.012%)	7,130 (0.021%)	4,999 (0.015%)	8,288 (0.025%)	33,741,915
30 poly–T	2,324 (0.007%)	5,276 (0.016%)	3,324 (0.010%)	6,204 (0.019%)	33,741,915
15 poly–A	38,294 (0.113%)	57,729 (0.171%)	46,845 (0.141%)	64,680 (0.195%)	33,165,380
15 poly–T	31,843 (0.094%)	47,676 (0.141%)	37,712 (0.114)	53,642 (0.162%)	33,165,380

6.9.2.3 Ensamblaje *de novo* del transcriptoma de *C. corteziensis*

El programa CLC fue corrido bajo Windows Vista en una computadora de 64 bits con 16 Gb de memoria RAM. Las lecturas limpias de los cuatro archivos en formato fasta fueron incorporadas en el ensamblador CLC con los parámetros establecidos por el programa con k–meros de 24.

La carencia de un transcriptóma de referencia nos condujo al ensamblaje de novo con las lecturas de las cuatro librerías para generar una aproximación del transcriptoma de *C. corteziensis.* Posteriormente cada librería fue mapeada en el transcriptoma preliminar para obtener el número de contigs por librería. Se compararon las lecturas de la librería de la condición considerada como control vs la librería con alta infección, calculando la expresión diferencial *in silico* mediante CLC utilizando la normalización RPKM (*reads per kilobase per million of bases mapped*).

6.9.2.4 Anotación del transcriptoma de *C. corteziensis*

Las secuencias de los 105,215 contigs fueron incorporados en el programa Blast2Go (Conesa y Götz, 2008) y se les buscó homología mediante la opción blastn, posteriormente se realizó la anotación con los parámetros preestablecidos, y se realizaron búsquedas con

las opciones Interpro y Annex para incrementar la anotación.

6.9.3 Hibridización de microarreglos

Se realizaron hibridaciones heterólogas en el microarreglo de ADN de *Drosophila melanogaster* con sondas de 70 pb que representan 15,139 genes, proporcionado por la Unidad de Microarreglos de la UNAM. El ARN fue extraído de acuerdo al protocolo descrito en la sección 6.9.1. Para el arreglo A se extrajo ARN de un ostión de Nayarit con intensidad uno respecto a un ostión con intensidad cuatro, para el arreglo B se extrajeron ARNs de tres ostiones de BCS con infección uno respecto a tres ostiones con infección dos, y para el arreglo C se extrajo ARN de tres ostiones con *P. marinus* con infección natural nivel tres y de tres ostiones inyectados con *P. marinus* con intensidad nivel cinco.

El ARN (5 µg) fue retrotranscrito con 1 µg de oligo dT y 3 µg de iniciadores aleatorios (random primers) en un volumen final de 20 µl incubados a 70°C durante 10 min. El ARN fue incubado toda la noche a 25°C con: $MgCl_2$ (25mM), dNTPs *mix–aminoallyl* (4µl), amortiguador 5× *Chipshot RT* (8 µl), y transcriptasa reversa (3.2 µl) del sistema *ChipShot indirect labeling and clean–up* (Promega, Z4000). Los restos de ARN fueron eliminados con 1 µl de RNase H y 0.35 µl de la solución RNAse incubando a 37°C durante 15 min. El ADNc con aminoallyl (aa–cDNA) fue purificado con la columna del sistema Promega y eluído con 4.5 µl de agua, los cuales fueron evaporados por una hora en el sistema de vacío. Los fluoróforos Alexa 555 y Alexa 647 (Life, Technologies, Invigtoren, A32756 y A32757) disueltos en 4.5µl de DMSO fueron incorporados al aa–cDNA durante 60 min. Cada muestra del aa–cDNA diluido en 72 µl fue purificada en columnas del sistema promega, y nuevamente eluidos con 100 µl de agua. El aa–cDNA fue cuantificado por espectrofotometría en el Nanodrop 2000.

El microarreglo fue prehidratado con vapor y fijado al vidrio con dos ciclos de luz UV 0.12 J × cm^2. Posteriormente se realizó un lavado con SDS al 0.1% y dos lavados con agua desionizada. Los arreglos fueron prehibridizados (SSC 5X, SDS 0.1%, BSA 1%) durante 1 hr a 42ºC continuando con cinco lavados con agua desionizada y secados por

centrifugación (1,500 rpm durante 5 min). Los aa–cDNA resuspendidos con solución de hibridación (SSC 20X, SDS 1%, TE en 70 µl) fueron mezclados y desnaturalizadas a 94ºC por 5 min y a 65ºC durante 30 seg. Las mezclas fueron aplicadas sobre los microarreglos posteriormente cubiertos con un cubreobjetos (HybriSlip Schleicher and Schuell) y colocado en una cámara de hibridación durante 12 hrs a 42ºC. Los arreglos fueron enjuagados un par de veces en 50 ml de SSC 1X, SDS 0.05%, seguidos de cuatro lavados con SSC 0.06X y el exceso de la solución fue retirado mediante centrifugación a 1,500 rpm durante 5 min.

6.9.3.1 Análisis de microarreglos

La lectura del microarreglo se realizó en el escaner de lectura confocal ScanArray 4000 Packard Biochips. La imagen escaneada fue analizada con una rejilla que delimita cada spot utilizando el programa GenPix–Pro7 (Molecular Devices). Para cada punto se determinó la media de las densidades de las fluorescencias de Alexa 555 y Alexa 647, así como la media del ruido de fondo y la normalización de los canales calculados con en programa ArrayPro Analyzer (Molecular Devices).

El análisis de los microarreglos fue realizado con el programa GenArise, desarrollado en la Unidad de Computo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (http://www.ifc.unam.mx/genearise/). GenArise realizó las transformaciones: correcciones del ruido de fondo, normalización, filtrado de la intensidad, análisis de réplicas y expresión diferencial de genes. El programa calculó la desviación estándar respecto a la media de cada punto para definir el Z–score en donde Zi = (Ri – media (R)) / sd (R) en donde Zi es el Z–score para cada punto, Ri es Log–radio de cada punto, y sd (R) es la desviación estándar del Log–radio. Con este criterio, los genes con Z–score > 1.5 fueron considerados como genes expresados diferencialmente entre condiciones.

6.9.3.2 Selección de genes de referencia y genes de respuesta inmune

A partir de los tres microarreglos se obtuvieron los números de identificación de los genes

que no presentaron diferencias entre condiciones con Z–score < 1, genes sobreexpresados con Z–score > 1.5 y genes con Z–score < 1.5, para los cuales se obtuvo la anotación ontológica de cada gen mediante el programa Blast2Go versión PRO utilizando la opción Biomart.

A partir de los genes que no presentaron diferencias de expresión entre condiciones (Z–score < 1) se identificaron los genes comunes entre los tres microarreglos mediante un diagrama de Venn (http://www.bioinformatics.lu/venn.php) seleccionando los genes con función ribosomal, genes de elongación y genes del citoesqueleto para ser evaluados como genes de referencia.

Los genes de respuesta inmune expresados diferencialmente con Z–score > 1.5 y Z–score > –1.5 fueron incorporados al programa String v.9.05 (http://string-db.org/) obteniendo interactomas que permitieron visualizar los mecanismos de respuesta inmune de manera global, y la interacción de genes de interés para cuantificar los niveles de expresión relativa por qPCR.

Los genes homólogos de *Drosophila melanogaster* fueron buscadas localmente mediante blast en el transcriptoma de *C. corteziensis* secuenciado en este estudio mediante RNA–Seq, Illumina 2000 descrito en la sección 6.9.2. Las secuencias con las mayores similitudes fueron obtenidas para el diseño de oligonucleótidos específicos utilizando el programa Primer3 v.0.4.0 (http://frodo.wi.mit.edu/). Mediante el programa DNAcalculator (http://sigma–genosys.com/calc/DNACalc.asp) se verificó que las temperaturas de alineamiento de los iniciadores fueran entre 60 y 65°C, se revisó que el contenido GC fuera del 45% como mínimo, siendo el óptimo entre 50 y 60%, y se corroboró la no formación de dimeros y estructuras secundarias. En OligoAnalyzer 3.1 (http://www.idtdna.com) se verificó que en caso de que los iniciadores formaran heterodimeros y dimeros la Tm fuera menor a 60°C, y se verificó que la energía libre de gibbs de los dimeros y heterodimeros estuvieran por debajo de -9 G con los parámetros: 0.5 mM $MgCl_2$ y 0.2 de dNTPs.

6.9.3.3 Síntesis de ADNc para la validación de genes específicos

El ARN total de branquias de ostiones *C. corteziensis* (10 µg) fue tratado con 1 U de DNAsa (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, AM2238) y 5 µl del amortiguador 10× turbo DNAse en un volumen total de 50 µl, la mezcla fue incubada durante 30 min a 37°C y la reacción fue detenida incubando la reacción a 75°C durante 10 min con EDTA a una concentración final de 15 mM. La eliminación de ADN fue verificada mediante la no amplificación por PCR del gen actina–β.

La retrotranscripción del ARN (~1 µg) de 15 branquias de ostiones experimentales se realizó con 0.5 µg (1 µl) de oligo dT incubados a 70°C durante 5 min seguidos del enfriamiento en hielo durante 5 min adicionando 1 µl de transciptasa reversa ImProm–II (Promega, Madison;WI, USA, A3802), 4 µl de amortiguador 5× Improm-II, 30 mM de $MgCl_2$, 0.5 mM de dNTPs, 40 U de RNAsin (Promega,N2515) en un volumen total de 20 µl, la mezcla fue anillada a 25°C por 5min, extendida a 42°C por 60 min, y la inactivación de la enzima se realizó a 70°C por 15 min.

6.9.3.4 Amplificación de genes por PCR punto final

Para verificar la amplificación de los genes de interés con los iniciadores previamente diseñados, se realizaron PCRs con temperaturas de alineamiento de 55 y 60°C. El ADNc consistió de una mezcla de muestras aleatorias de *C. corteziensis* y como control positivo de amplificación se utilizaron iniciadores que amplifican el gen actina–β. Se realizó una electroforesis con los productos de PCR incorporados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo UV.

6.9.3.5 Cuantificación de la expresión relativa por qPCR

El análisis de expresión relativa se realizó a partir de ostiones procedentes del bioensayo, los organismos control que no fueron inyectados con *P. marinus* fueron clasificados como ostiones control con intensidad tres (C3, n=2) y ostiones control con intensidad cuatro (C4, n=6). Los ostiones inyectados con *P. marinus* se agruparon en ostiones inyectados con nivel cuatro (I4, n=3) e inyectados con intensidad cinco (I5, n=4).

El PCR cuantitativo (qPCR) se realizó en el equipo CFX96 de Bio–Rad, cada reacción por triplicado se elaboró con 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.15 mM de dNTPs, 0.45 U de Go*Taq* Flexi DNA polimerasa, 3 µl del amortiguador 5× (Promega, M8295) y 1× de EvaGreen (Biotum, 3100) en 15 µl de volumen final (Llera-Herrera et al., 2012). La concentración de los iniciadores fue entre 0.2 a 0.5 µM dependiendo de la eficiencia obtenida para cada juego de iniciadores. Las reacciones de amplificación se realizaron a 94°C durante 3 min, seguido de 40 ciclos de 94°C (10 seg), 60°C (30 seg), la adquisición de las lecturas se realizó a 78°C (2 seg), y la disociación fue adquirida de los 60°C a los 94°C cada 0.5°C/ciclos. La eficiencia de cada juego de iniciadores se determinó mediante curvas estándares con diluciones seriales de 1:10 ó 1:5 del producto de PCR. Los valores de eficiencia (Tabla IV) fueron utilizados para calcular los valores cuantitativos.

Los estabilidad relativa de los cuatro genes candidatos a ser utilizados como genes de referencia, fue calculada con los Cq de todas las muestras para cada gen utilizando los metodos: Delta CT, BestKeeper, Normfinder y geNorm. El factor de normalización (*FN*) fue calculado con la media geométrica de los valores relativos de los tres genes más estables mediante la fórmula *FN* =geomean*RQ* (RPL10, GAPDH, RPL8), donde *RQ*ij = *E* (Cq(min) – Cqij), *E* es la eficiencia específica de cada gen, y (Cq(min) – Cqij) es el Cq mínimo de todas las muestras para cada gen menos la media de los Cq por muestra. Los valores de relativos (*RQ*) para cada gen de respuesta inmune fueron normalizados para obtener la expresión relativa por muestra con la siguiente fórmula $RE = RQ/FN$.

Las diferencias de expresión relativa por gen entre las cuatro condiciones de infección fueron calculadas utilizando ANOVA de una vía con el programa STATISTICA v.6.0. (StatSoft, EU), y las diferencias significativas entre grupos fueron realizadas utilizando la prueba post–hoc de Fisher, consideradas diferentes cuando $P < 0.05$.

7 RESULTADOS

7.1 Prevalencia de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis*

Mediante el diagnóstico por PCR se obtuvo la amplificación un fragmento de 532 pb del ITS de *Perkinsus* sp. a partir de branquias de *C.* corteziensis de Nayarit. La prevalencia de *Perkinsus* sp. en branquias de ostiones colectados de Boca de Camichín fue del 95.65% por el método de FMT y 92% utilizando el diagnóstico por PCR, siendo mayor a la prevalencia registrada en ostiones de Pozo Chino que presentaron *Perkinsus* sp. en el 74.2% de los organismos analizados por FMT y 77.4% mediante el análisis de PCR (Tabla IV).

Tabla IV. Prevalencia de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis* de dos esteros de Nayarit.

Sitio	Tejido	No. de muestras positivas por FMT/ No. de muestras analizadas	Prevalencia (%) por FMT	No. de muestras positivas por PCR/ No. de muestras analizadas	Prevalencia (%) por PCR
Boca de Camichín	Branquias	22/23	95.65	23/25	92
	Sistema digestivo	19/21	90.47	N.A.	N.A.
Pozo Chino	Branquias	20/31	64.51	24/31	77.4
	Sistema digestivo	19/27	70.37	N.A.	N.A.

N.A. No analizado.

7.2 Intensidad de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis*

Mediante el crecimiento de los trofozoitos de *Perkinsus* sp. en FMT se observó al protozoario tanto en branquias como en sistema digestivo (Fig. 5). Los trofozoitos se observaron en agregaciones en el sistema digestivo, a diferencia de las branquias en donde la dispersión del protozoario fue mayor (Fig. 5a y 5b). En los trofozoitos maduros que obtuvieron color azul después de ser teñidas con lugol, se observó el núcleo periférico, una vacuola prominente y la forma de anillo característica de *Perkinsus* sp. (Fig. 5c y 5d).

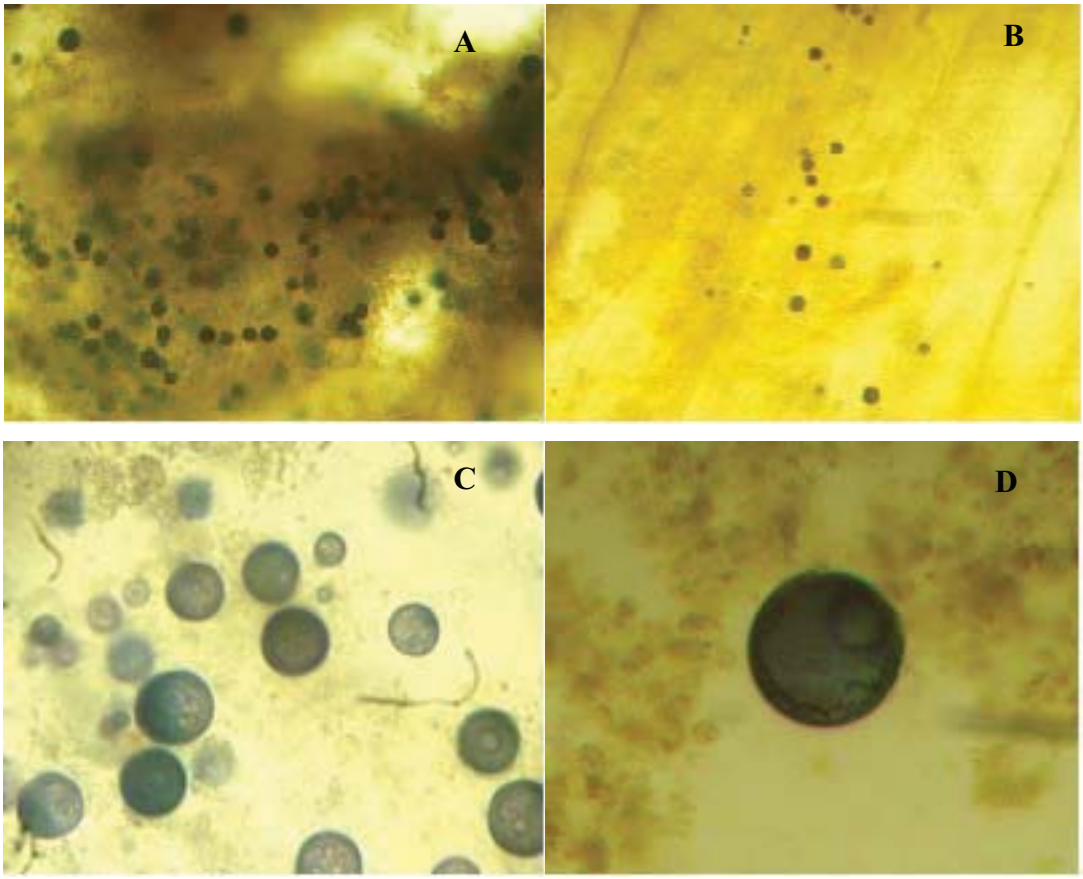


Fig. 5. Células de *Perkinsus* sp. teñidas con lugol en sistema digestivo (A) y branquias de *C. corteziensis* (B), mostrando la morfología típica con núcleo excéntrico y vacuola prominente, característica de *Perkinsus* sp. (C, D). Visualizadas bajo microscopio con los objetivos 10X (A, B), 20X (C) y 40X (D).

La ausencia (nivel cero de la escala de Mackin) de *Perkinsus* sp. fue mayor en ostiones de Pozo Chino (34.5% en branquias y 31% en sistema digestivo) respecto a los ostiones de Boca de Camichín (4.8% en branquias y 9.5 en sistema digestivo). Los ostiones de Boca de Camichín presentaron un mayor porcentaje en las infecciones más intensas (3–6) tanto en branquias como en sistema digestivo, a diferencia de los organismos de Pozo Chino que presentaron el mayor número de organismos infectados con niveles de 1–2 en ambos tejidos (Fig. 6).

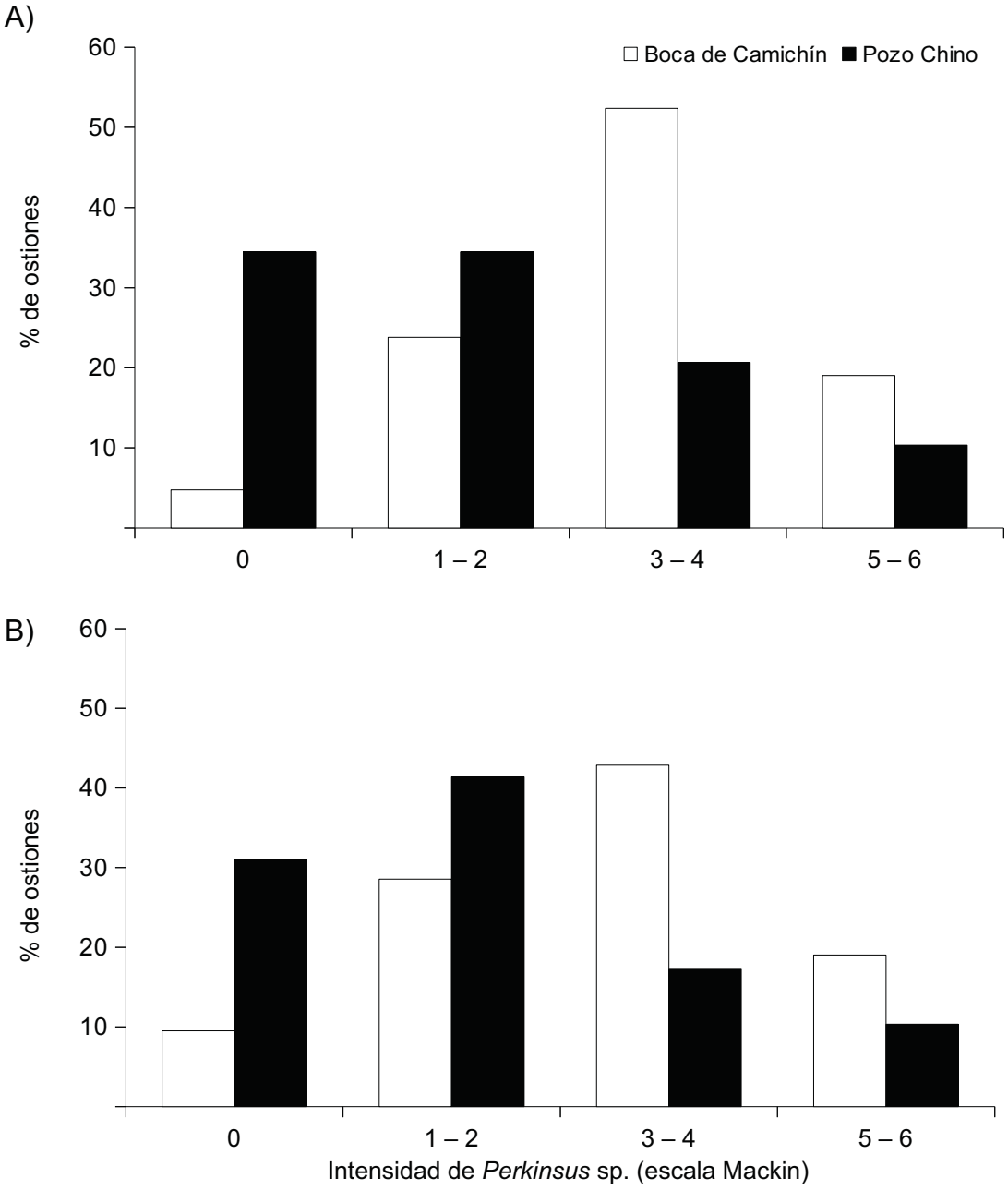


Fig. 6. Intensidad de *Perkinsus* sp. en branquias (A) y sistema digestivo (B) de *C. corteziensis* de Boca de Camichín (barras en blanco) y Pozo Chino (barras en negro).

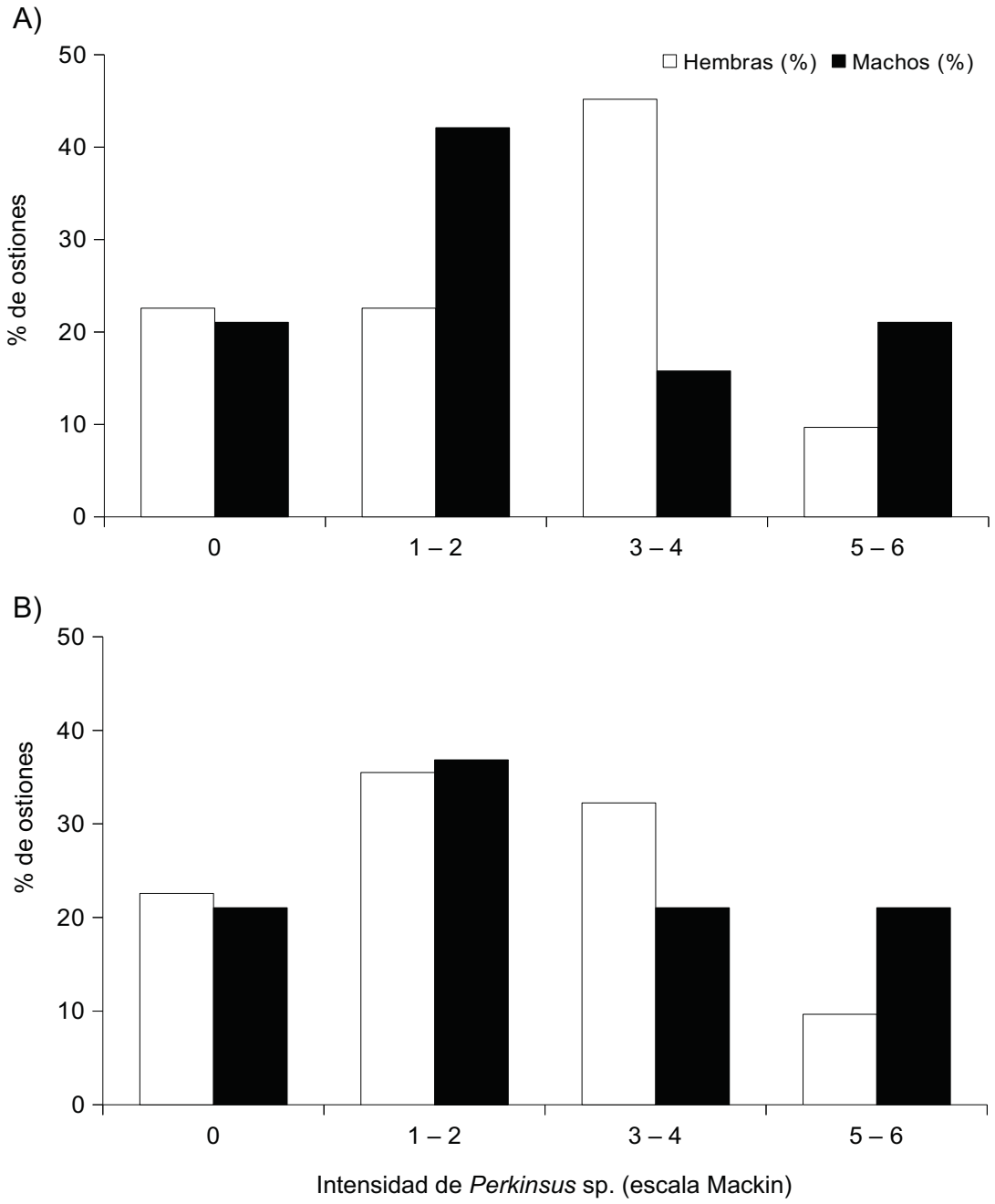


Fig. 7. Intensidad de *Perkinsus* sp. en branquias (A) y sistema digestivo (B) de *C. corteziensis* en hembras (barras blancas) y machos (barras negras).

En hembras se observó que el incremento de la infección en branquias está relacionado con

el decremento en la madurez. El 100% de las hembras con infecciones 5–6 presentaron estuvieron en estadío II, a diferencia del 70% de las hembras no infectadas que estuvieron en estadío II y el 30% restante estuvo en estadio III.

Los machos presentaron estadíos de mayor madurez (estadío V) respecto a las hembras. Machos con infecciones entre 1–2 presentaron los organismos con la mayor madurez. A diferencia de las hembras, los machos en todas las categorías de infección presentaron estadíos II y III (Fig. 8).

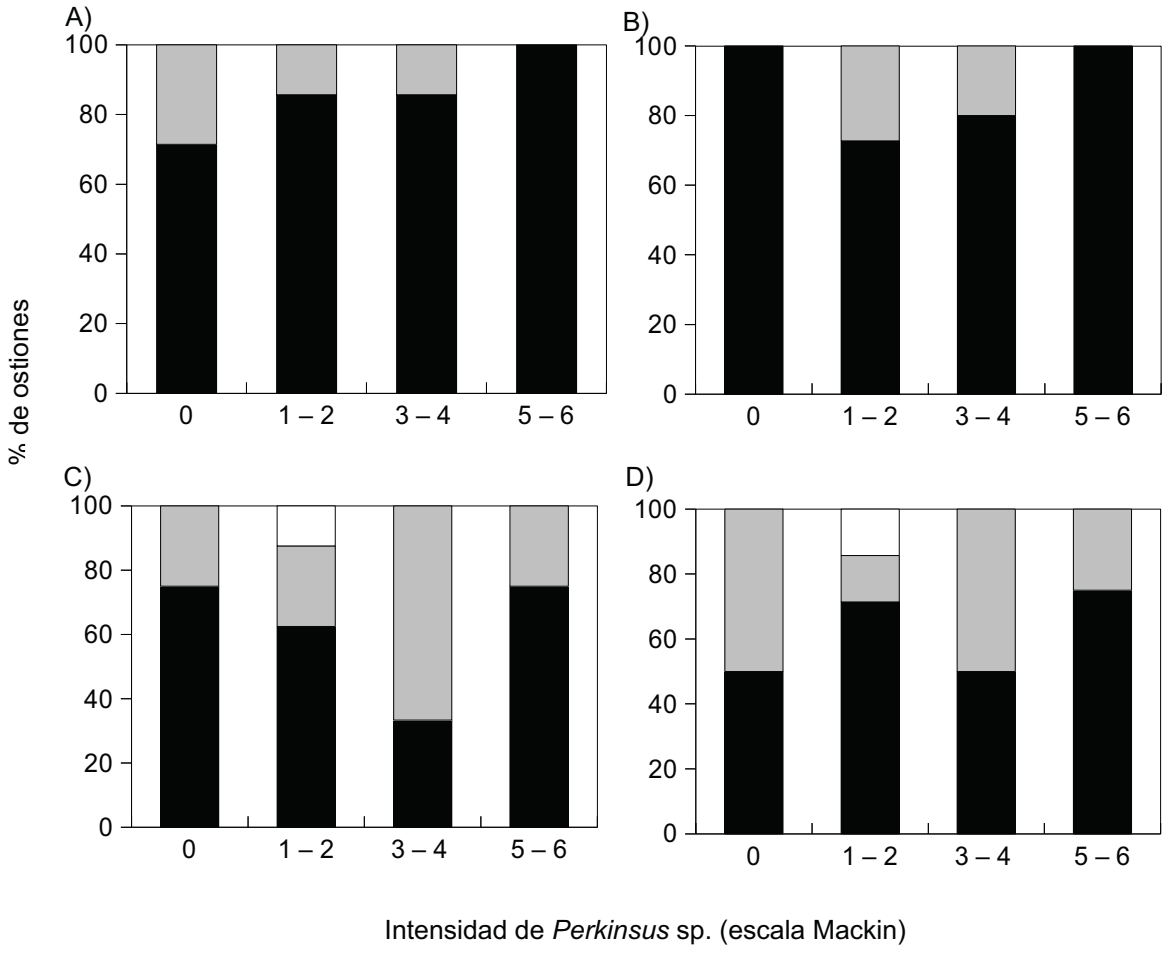


Fig. 8. Condición reproductiva en relación a la intensidad de la infección por *P. marinus* en branquias (A, C) y sistema digestivo (B, D) en hembras (A, B) y machos (C, D). Las barras negras representan el estadio II, grises estadio III y blancas estadio V.

7.3 Análisis histológico de *C. corteziensis* infectado con *Perkinsus* sp.

Mediante la visualización de los tejidos teñidos con HE se observó la inclusión de *Perkinsus* en los tejidos de *C. corteziensis.* La infección fue corroborada con la presencia intracelular de *Perkinsus* sp. que forma un halo tanto en branquias como en epitelio digestivo de *C. corteziensis*. El tamaño (aproximado de 10 µm) y la forma que presenta el protozoario son característicos de *P. marinus* (Fig. 9). Todas las muestras fueron observadas bajo microscopio, sin embargo, la presencia de *Perkinsus* sp. únicamente se observó en las muestras de mayor infección, debido a que el protozoario presenta tallas pequeñas (5–40 µm).

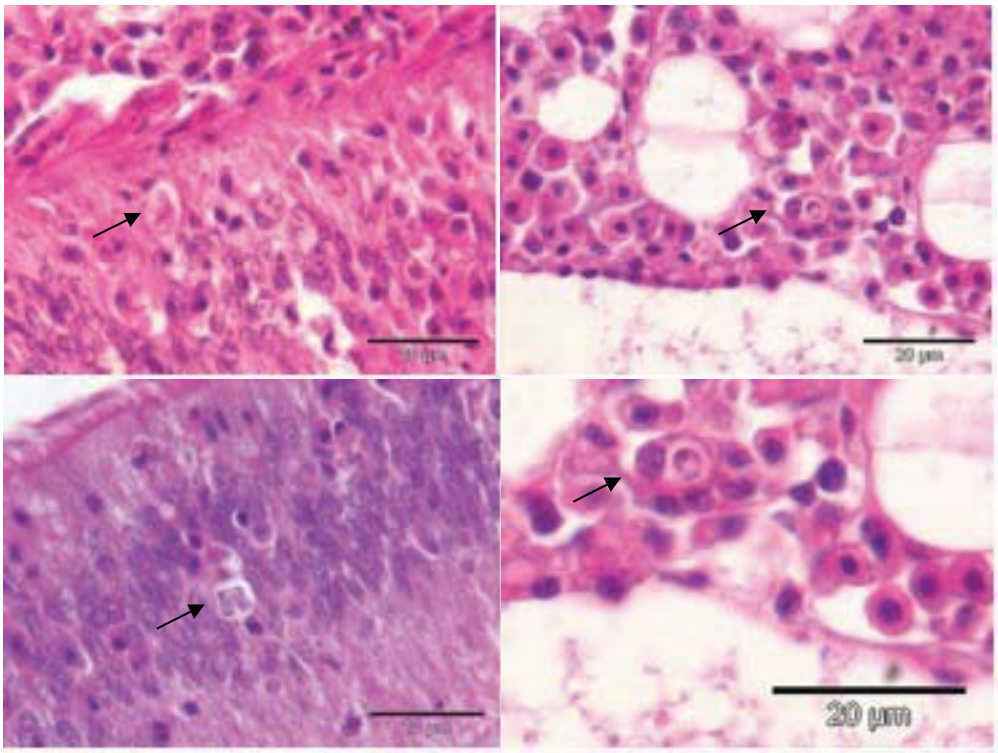


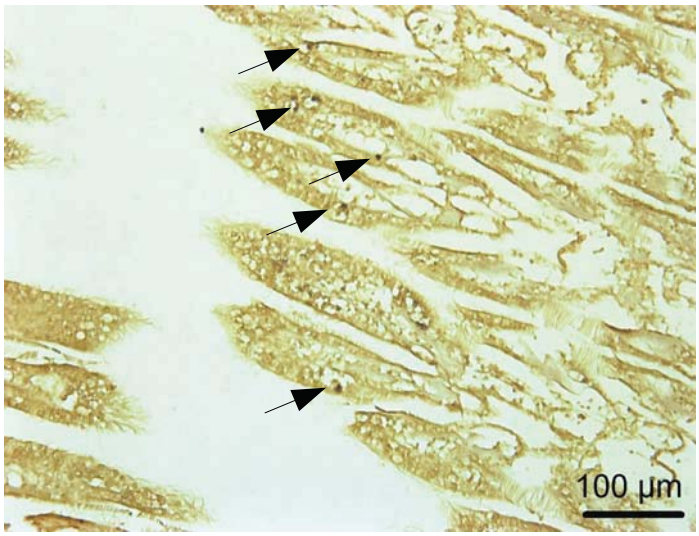
Fig. 9. Trofozoitos intracelulares de *Perkinsus* sp. en el epitelio digestivo de *C. corteziensis*, se presenta la forma de anillo con el núcleo periférico y una vacuola prominente con trofozoitos en su interior.

7.3.1 Hibridación *in situ*

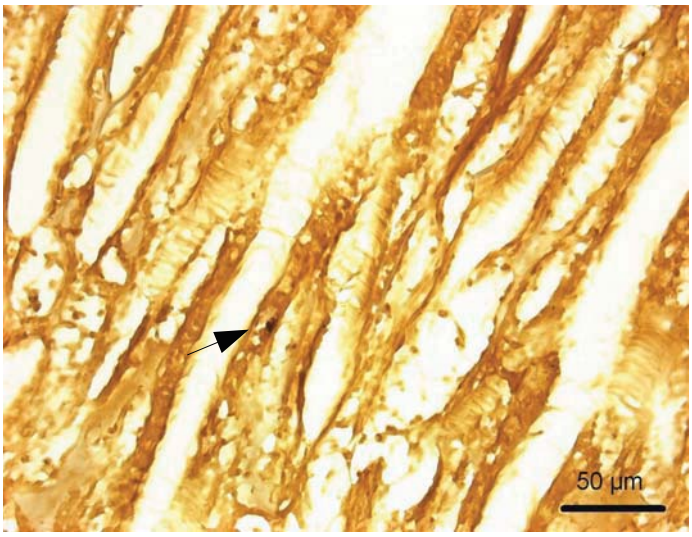
La hibridación a *Perkinsus* sp., fue observada únicamente en branquias de *C. corteziensis*

(Fig. 10). Las hibridaciones fueron corroboradas en los tejidos teñidos con HE, en donde se observó la morfología característica de *P. marinus*. Como control positivo, se hibridó a *P. olseni* en el epitelio digestivo de *Ruditapes decussatus* (Fig. 10C).

A)



B)



C)

Fig. 10. Hibridación *in situ* de *Perkinsus* sp. en branquias de *C. corteziensis*, (B) Hibridación intracelular en branquias de *C. corteziensis*, (C) Hibridación en *P. olseni* en el epitelio digestivo de *Ruditapes decussatus* (control positivo).

7.4 Evaluación de coinfecciones mediante restricción del ITS de *Perkinsus* sp.

La amplificación del ITS de *Perkinsus* sp. a partir de branquias de *C. corteziensis* presentó un fragmento de 532 pb (Fig. 11A, 11B, 12A, 12B), similar a los productos obtenidos para *P. olseni* y *P. chesapeaki* (538 y 550 pb respectivamente). Al realizar la restricción con las enzimas *Rsa*I y *Hinf*I se obtuvo que el patrón de digestión de todos los productos ITS obtenidos a partir de *C. corteziensis*, son diferentes a los patrones de los controles de *P. olseni* y *P. chesapeaki* (Fig. 11C, 11D, 12C, 12D). Todas las muestras presentaron el patrón de restricción esperado para *P. marinus.*

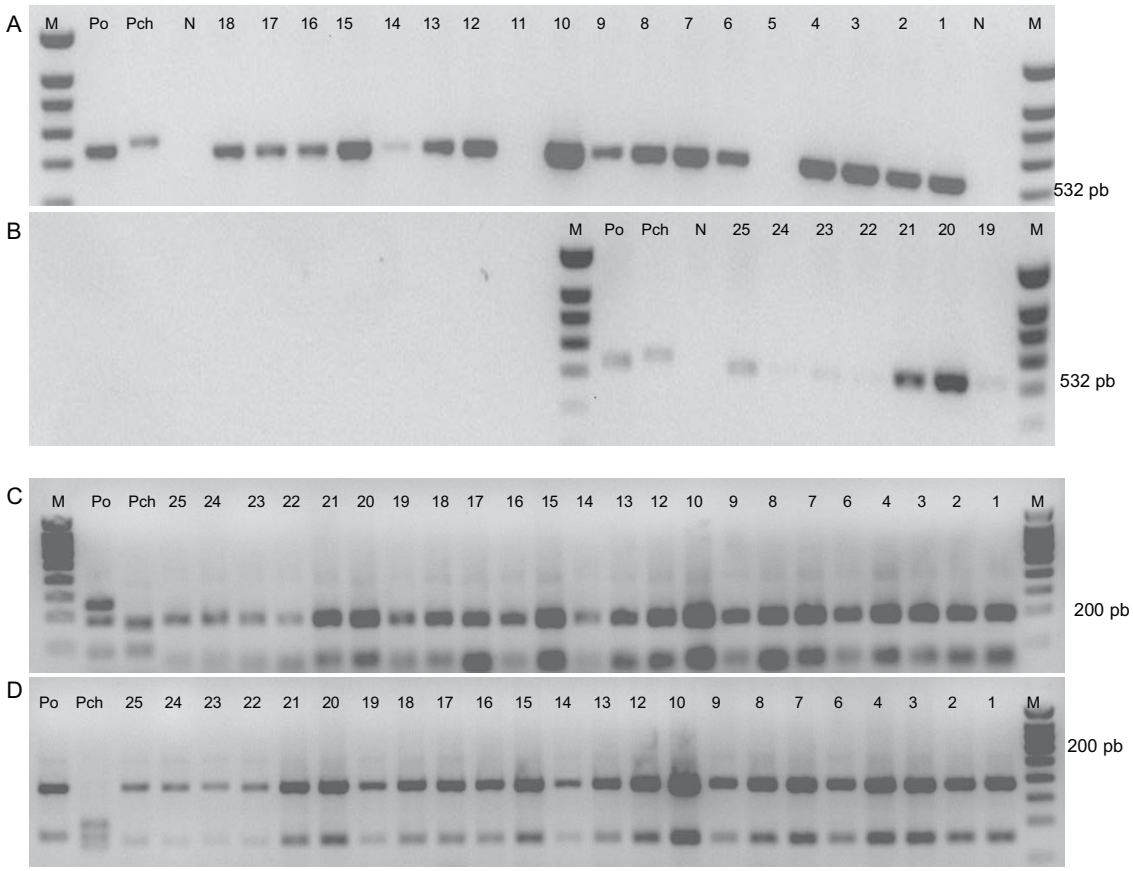


Fig. 11. A, B) Fragmentos del ITS de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis* de Boca de Camichín, y B) Restricción de los fragmentos con la enzima *Rsa*I y C) *Hinf*I.

Tabla V. Prevalencia e intensidad de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis* de Boca de Camichín.

No. de organismo	PCR ITS	Digestión con *RsaI* y *Hinf*I	Resultado de la digestión	Intensidad* en branquias	Intensidad* en sistema digestivo
1	+	Digerida	+	4	4
2	+	Digerida	+	4	4
3	+	Digerida	+	N.A.	N.A.
4	+	Digerida	+	4	2
5	N.D.	N.A.	N.A.	1	1
6	+	Digerida	+	3	2
7	+	Digerida	+	4	4
8	+	Digerida	+	2	1
9	+	Digerida	+	1	0
10	+	Digerida	+	4	4
11	N.D.	N.A.	N.A.	4	4
12	+	Digerida	+	N.A.	N.A.
13	+	Digerida	+	3	3
14	+	Digerida	+	5	5
15	+	Digerida	+	1	1
16	+	Digerida	+	N.A.	N.A.
17	+	Digerida	+	1	0
18	+	Digerida	+	4	3
19	+	Digerida	+	2	2
20	+	Digerida	+	5	5
21	+	Digerida	+	5	5
22	+	Digerida	+	4	4
23	+	Digerida	+	3	3
24	+	Digerida	+	6	6
25	+	Digerida	+	1	1

N.D. No detectado; N.A. No analizada; *Referido a la escala de Mackin.

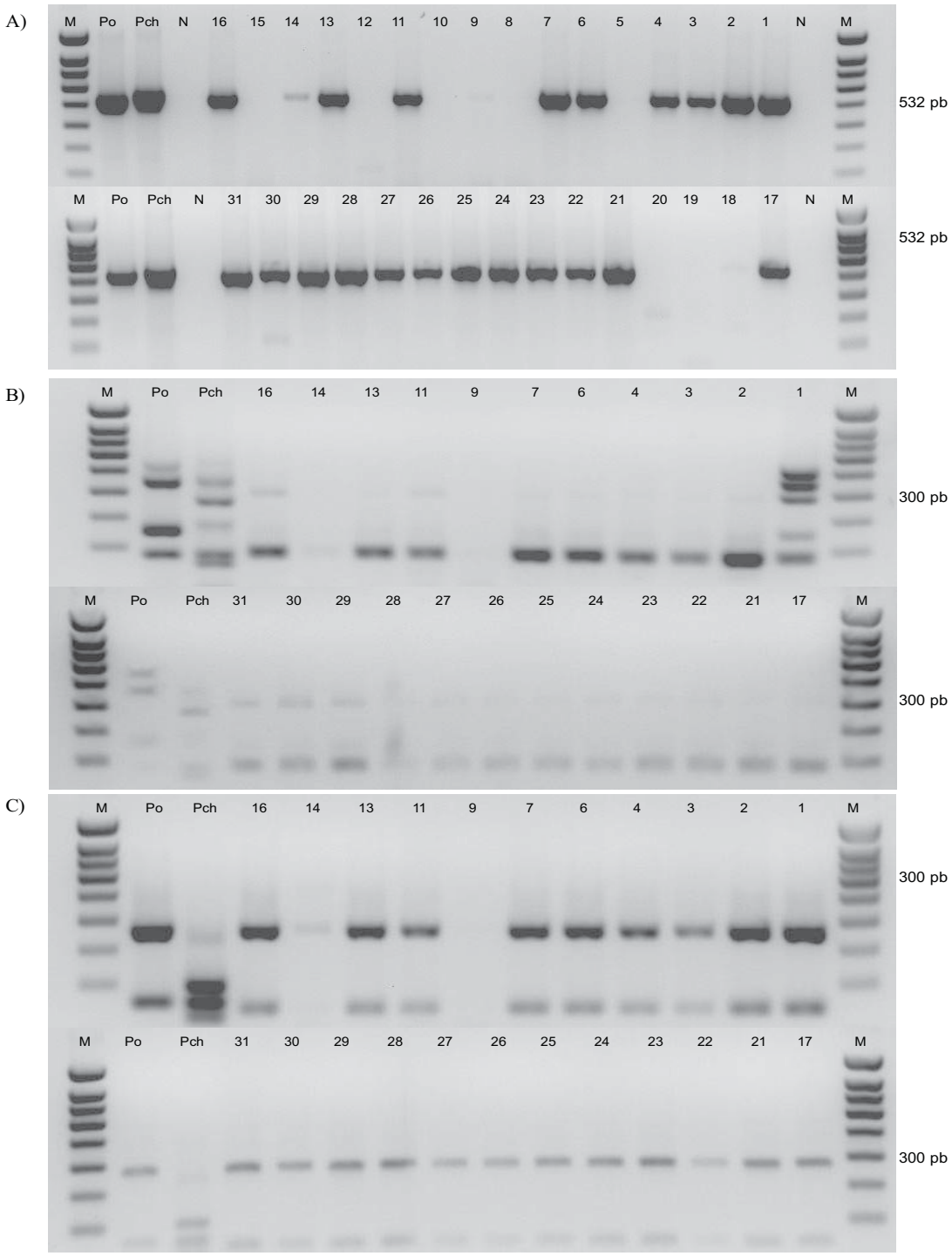


Fig. 12. A) Fragmentos de ITS de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis* del Estero Pozo Chino, B) Restricción de los fragmentos con la enzima *Rsa*I y C) digestión con *Hinf*I.

Tabla VI. Prevalencia e intensidad de *Perkinsus* sp. en *C. corteziensis* de Pozo Chino.

No. de organismo	PCR ITS	Digestión con *Rsa*I y *Hinf*I	Resultado de digestión	Intensidad* en branquias	Intensidad* en sistema digestivo
1	+	Digerida	+	0	1
2	+	Digerida	+	N.A.	N.A.
3	+	Digerida	+	4	2
4	+	Digerida	+	1	1
5	+	Digerida	+	1	0
6	N.D.	N.A.	N.A.	0	0
7	+	Digerida	+	2	3
8	+	Digerida	+	1	0
9	N.D.	N.A.	N.A.	0	0
10	+	Digerida	No detectado	0	1
11	N.D.	N.A.	N.A.	0	1
12	+	Digerida	+	1	1
13	N.D.	N.A.	N.A.	1	1
14	+	Digerida	+	0	0
15	+	Digerida	+	0	0
16	N.D.	N.A.	N.A.	0	0
17	+	Digerida	+	2	1
18	+	Digerida	+	2	1
19	+	N.A.	N.A.	0	0
20	N.D.	N.A.	N.A.	0	0
21	N.D.	N.A.	N.A.	0	0
22	+	Digerida	+	4	3
23	+	Digerida	+	3	3
24	+	Digerida	+	4	4
25	+	Digerida	+	1	1
26	+	Digerida	+	5	5
27	+	Digerida	+	3	1
28	+	Digerida	+	5	5
29	+	Digerida	+	6	6
30	+	Digerida	+	1	1
31	+	Digerida	+	3	3

N.D. No detectado; N.A. No analizada; *Referido a la escala de Mackin.

7.5 Análisis de variabilidad génica de *P. marinus* en *C. corteziensis*

7.5.1 Variabilidad génica del ITS de *P. marinus* en *C. corteziensis* de Nayarit

El juego de iniciadores PerkITS1 amplificó 532 pb del ITS de *Perkinsus* sp, sin embargo, solo 485 pb fueron consideradas informativas e incluidas en el análisis. La región ITS incluyó 108 pb del ITS1, 159 pb de la región ribosomal 5.8S y 218 pb del ITS2. De ostiones de Boca de Camichín se obtuvieron 25 secuencias y 20 secuencias fueron obtenidas de ostiones de Pozo Chino. De un total de 45 secuencias, 20 presentaron al menos un polimorfismo. En total se presentaron 25 sitios polimórficos que incluyeron 18 transiciones y 5 transversiones (Tabla VII). En el ITS1 se presentó solo una transversión en la tercera posición, y en el ITS2 se presentaron cuatro transversiones y nueve transiciones. En la región 5.8S no se presentaron transversiones.

Las secuencias más frecuentes fueron JQ266236 y JQ266240. La secuencia JQ266236 fue obtenida a partir de 6 clonas de ostiones de Pozo Chino y 7 de Boca de Camichín. La secuencia JQ266240 fue obtenida de 5 clonas de ostiones de Pozo Chino y 8 de Boca de Camichín. La transversion más frecuente (A/C) se ocurrió en la posición 446 (JQ266236 respecto a JQ266240), la cual fue aislada de tres ostiones de Boca de Camichín y de dos ostiones de Pozo Chino.

7.5.2 Homología del ITS de *Perkinsus*

La secuencia JQ266236 caracterizada de *C. corteziensis* tiene 100% de identidad y cobertura con el ITS de *P. marinus* de Carolina del Sur [SC2-4 (AY295197)], Nueva Jersey [NJ3-1-6 (AY295188)], Maryland [MA2-11-3 (AY295184) y MA-1-12 (AY295182)], Texas [TXsc (AF150990) y TCMD-1 (AF150990)], y Wright Island, Maryland [WIMD-2 (AF150989)]. La similitud de la secuencia JQ266236 con el ITS de *P. olseni* ITS (GenBank U07701) fue del 96%. La secuencia JQ266240 fue idéntica al ITS de *P. marinus* de Bahía Kino, Sonora, México [Kino0806 (GQ861511)], Carolina del Sur [SC3-2-8 (AY295199) y SC2-4-7 (AY295196)], Nueva Jersey [NJ3-1-6 (AY295188)], y Louisiana [LA8-11-1B

(AY295178) y UBMD-3 (AF150986)]. La similitud con la secuencia JQ266240 con el ITS de *P. olseni* ITS (U07701) fue del 95%.

Al separar los fragmentos del ITS, se obtuvo que las secuencias del 5.8S tienen 100% de identidad con: *P. marinus*, *P. olseni*, *P. mediterraneus* y *P. honshuensi*. Lo que confirma que la secuencia de este gen no puede utilizarse para discriminar entre especies. Las secuencias del ITS1 tienen 100% de identidad con *P. marinus* con un valor de 1e-48, 4e-28 con *P. honsuensis*, 6e-27 con *P. olseni* y 7e-26 con *P. mediterraneus*. Las secuencias obtenidas a partir del ITS2 mostraron 100% de identidad con: *P. marinus* con valores de 2e-180, a *P. olseni, P. mediterraneus* y *P. honsuenis* con valores *E* de 2e-80, 2e-70 y 8e-69 respectivamente, indicando que para diferenciar entre especies de *Perkinsus* sp. es necesario utilizar la región completa del ITS.

Tabla VII. Sitios nucleotídicos polimórficos identificados en la región ITS1–5.8S–ITS2 de *Perkinsus marinus* de Pozo Chino (C) y Boca de Camichín (C). La primera secuencia es la base para identificar inserciones (I) y deleciones (D) indicadas en las columnas. Las transversiones están marcadas en las columnas grises y las transiciones en las columnas blancas.

Número de acceso	ITS1			5.8S								ITS2															No. *	P	C	N
	3	63	104	117	132	147	160	178	195	248	270	273	274	275	276	277	307	319	321	330	382	433	446	447	479				
JQ266231[A]	A	T	T	A	G	A	A	A	A	C	C	-	C	C	C	G	-	C	G	A	T	T	C	T	G	7P	1	-	1
JQ266232[A]								G				-					-								A	7P	1	-	1
JQ266233[B]										T		-					-						A		A	5P	1	-	1
JQ266234[A]												-					-			G					A	2C	-	1	1
JQ266235[B]									G			-					-						A		A	14C	-	1	1
JQ266236[A]												-					-								A	+	6	7	13
JQ266237[A]											T	-					D								A	9P	1	-	1
JQ266238[A]												-					-							C	A	9P	1	-	1
JQ266239[B]												-					-	T					A		A	15P	1	-	1
JQ266240[B]												-					-						A		A	++	5	8	13
JQ266241[B]		C										-					-				C		A		A	11C	-	1	1
JQ266242[A]							G					-					-								A	11C	-	1	1
JQ266243[A]						G						-					-								A	11C	-	1	1
JQ266244[B]					A							-					-						A		A	6P, 17C	1	1	2
JQ266245[B]												I	A	A	A	A	-						A		A	17C	-	1	1
JQ266246[B]				G								-					-						A		A	13P	1	-	1
JQ266247[A]	C											-					-		A						A	13P	1	-	1
JQ266248[A]												-					-					C			A	12C	-	1	1
JQ266249[A]	C											-					-								A	12C	-	1	1
JQ266250[A]			C									-					-					C			A	8C	-	1	1

*Protozoario de Boca de Camichín (C) y Pozo Chino (P). El número en paréntesis indica el total de clonas con la misma secuencia.+1C (2), 2C (2), 3C, 4C, 5P (2), 6P, 7P, 8C, 9P, 10P. ++2C, 3C (2), 4C (2), 6P, 10P, 13P, 14C (2), 15P (2), 16C. Los superíndices A y B en los números de acceso indican el clado en donde se agrupó la variable filogenética.

Tabla VIII. Sitios nucleotídicos polimórficos identificados en la región NTS de *Perkinsus marinus* de *Crassostrea corteziensis* de Pozo Chino (P), and Boca de Camichín (C). La primera secuencia es la base para identificar inserciones (I) y deleciones (D) indicadas en las columnas. Las transversiones están marcadas en las columnas grises y las transiciones en las columnas blancas.

Número de acceso	16	24	25	29	30	31	45	62	68	69	87	89	109	119	127	131	141	232	284	424	448	533	548	572	602	675	704	802	818	930	932	978	1009	1066	1131	No. *
JQ266251	T	T	T	C	A	A	C	T	G	T	T	T	T	C	A	A	A	G	I	A	T	-	A	T	T	G	T	A	T	T	G	-	G	G	G	14C
JQ266252	C	G	C	G	T	C	T	A	C	A	C	A	C			G			-			D	G					C			T	-		A	A	14C
JQ266253	C	G	C	G	T	C	T	A	C	A	C	A	C		G	G			-			-						C			T	-			A	14C
JQ266254	C	G	C	G	T	C	T	A	C	A	C	A	C			G		A	-			-						C			T	-			A	2C
JQ266255																	T		-			-										-			A	2C
JQ266256	C	G	C	G	T	C	T	A	C	A	C	A	C			G			-		C	-						C			T	I			A	18C
JQ266257	C	G	C	G	T	C	T	A	C	A	C	A	C	T		G			-			-						C		C	T	-			A	18C
JQ266258																			-	G		-										-	A		A	18C
JQ266259	C	G	C	G	T	C	T	A	C	A	C	A	C			G			-			-					C	C			T	-			A	7P
JQ266260	C	G	C	G	T	C	T	A	C	A	C	A	C			G			-			-				C		C			T	-			A	7P
JQ266261	C	G	C	G	T	C	T	A	C	A	C	A	C			G			-			-		C				C			T	-			A	7P
JQ266262																			-			-										-			A	10P
JQ266263																			-			-							C			-			A	10P
JQ266264																			-			-				A						-			A	10P

*Protozoario de Boca de Camichín (C) y Pozo Chino (P).

7.5.3 Filogenia del ITS de *P. marinus*

En base a las distancias calculadas con el modelo evolutivo Kimura2, el árbol filogenético de Neighbor Joining agrupó las secuencias del ITS de *P. marinus* de *C. corteziensis* en dos clados (A y B) con 66% de soporte bootstrap (Fig. 13). El clado A incluyó 13 secuencias ITS de ostiones de Boca de Camichín y 11 secuencias de Pozo Chino, y el clado B agrupó 12 secuencias ITS de ostiones de Boca de Camichín y nueve de Pozo Chino. En el clado A se agruparon secuencias ITS de *P. marinus* de Texas (Txsc), Maryland (MA, MD) y Parsons Island, MD (EBPIC), y Broomes). El clado B incluyó secuencias ITS de *P. marinus* de Kino-Sonora (Kino0806), Carolina del Norte (NC) y Upper Bay, MD (UBMD). Dentro de los dos clados se agruparon genotipos de *P. marinus* de Nueva Jersey (NJ), Louisiana (LA) y Carolina del Sur (SC).

Adicionalmente el árbol filogenético mostró un clado divergente a *P. marinus* de Nayarit, el cual agrupó a genotipos de *P. marinus* de Virginia (P1), Mobjack Bay, VA (MBVA), Kedges, MD (KS). El árbol filogenético de máxima parsimonia fue elaborado, sin embargo, no es reportado en este escrito debido a que los valores de soporte de bootstrap fueron bajos, lo cual es explicado por la baja substitución nucleotídica.

Las secuencias únicas de ostiones de Boca de Camichín fueron obtenidas tres ostiones para el clado A (30%), de tres ostiones para secuencias únicas agrupadas en el clado B (30%), secuencias únicas en los clados A y B fueron obtenidas de cuatro ostiones (40%). De Pozo Chino, dos ostiones presentaron secuencias ITS únicas agrupadas en el clado A (28.6%), un ostión presentó una secuencia única en el clado B (14.3%), y cuatro ostiones presentaron secuencias en ambos clados A y B (57.1%) (Fig. 14). Múltiples secuencias fueron encontradas en un mismo individuo, representando infecciones múltiples o variables del loci del ITS.

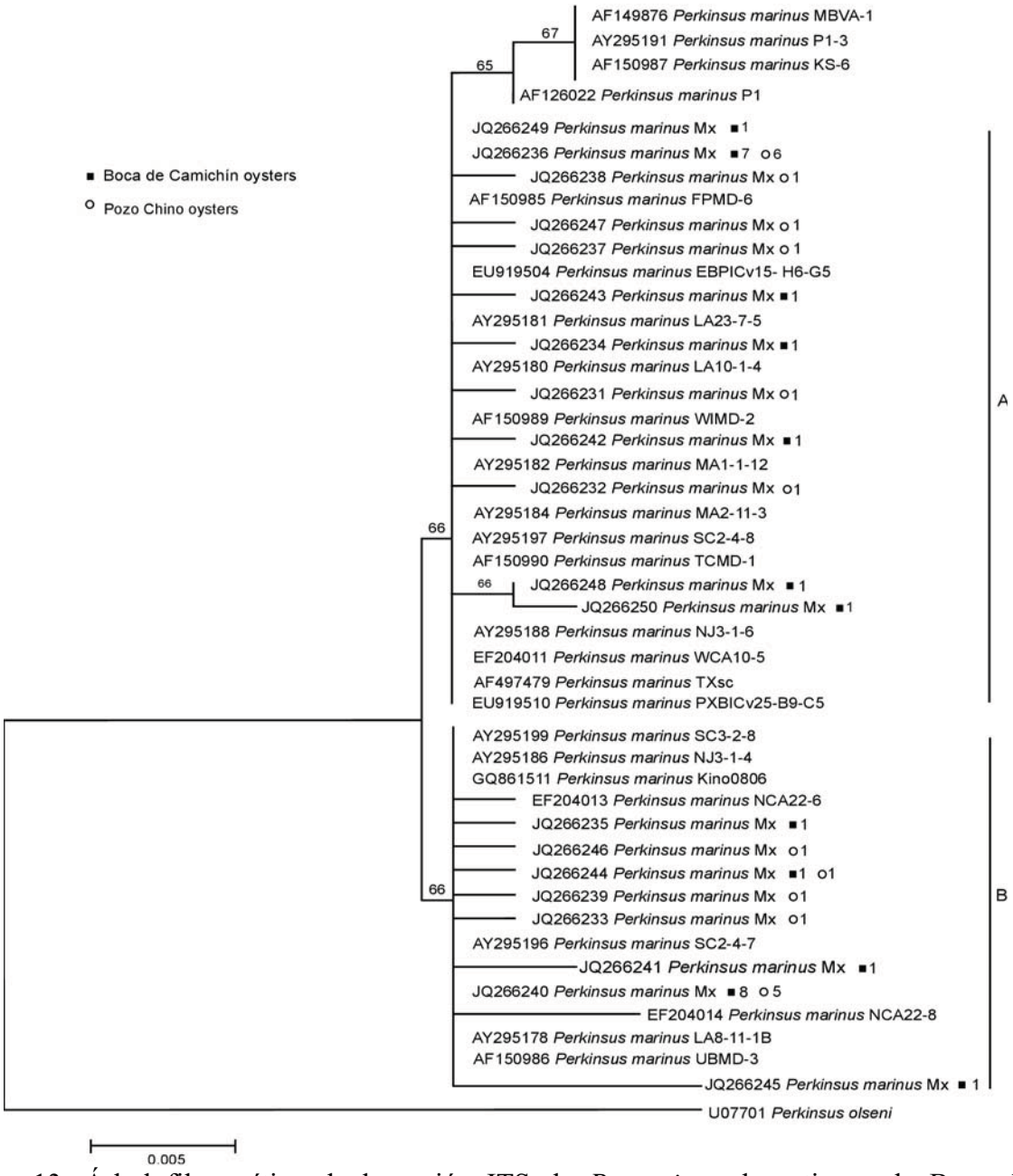


Fig. 13. Árbol filogenético de la región ITS de *P. marinus* de ostiones de Boca de Camichín (■) y Pozo Chino (○). Secuencias analizadas con el algoritmo neighbor–joining soportado por 10,000 bootstraps basado en el modelo Kimura–2–parameter. Las probabilidades de soporte se muestran en los nodos. En los clados A y B se incluyen las secuencias de *P. marinus* de Nayarit, México. A lado del símbolo se indica el número de clonas con la misma secuencia.

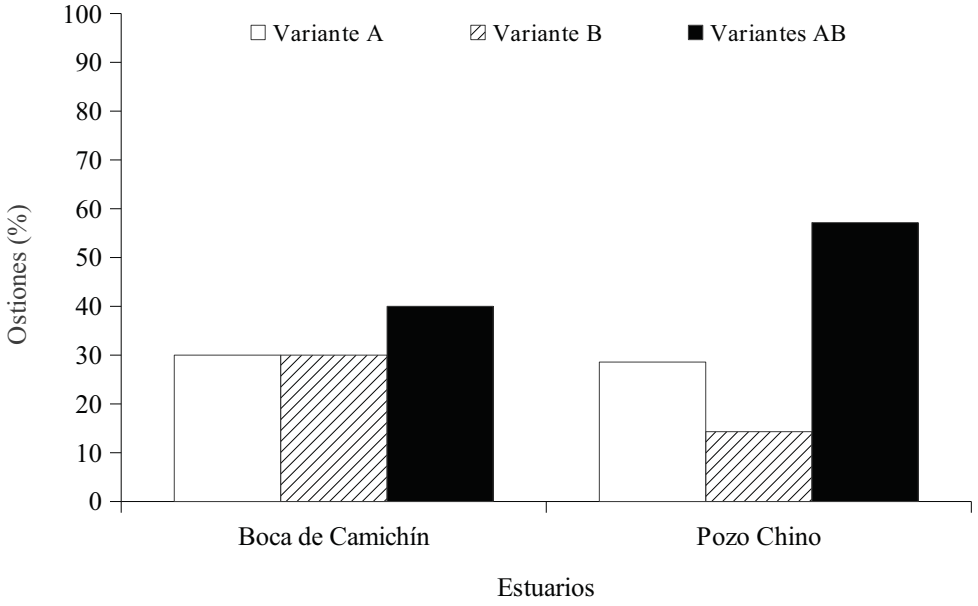


Fig. 14. Porcentaje de ostiones con diferentes variantes del ITS de *P. marinus* en *C. corteziensis* de dos sitios de Nayarit.

7.6 Variabilidad génica del NTS de *P. marinus* de *C. corteziensis* de Nayarit

7.6.1 Polimorfismo en el NTS de *P. marinus*

De la región NTS de *P. marinus* se obtuvieron 8 secuencias de ostiones de Boca de Camichín y 6 de Pozo Chino. Las 14 secuencias fueron diferentes en al menos un sitio nucleotídico. De los 30 sitios polimorfismo, 20 son transiciones y 10 transversiones (Tabla VIII). Es evidente que en la región NTS el polimorfismo se presenta en clonas de *Perkinsus* aislado a partir de un individuo.

7.6.2 Similitud de la región NTS de *Perkinsus*

Las secuencias obtenidas a partir del NTS tuvieron un porcentaje de similitud del 98% con *P. marinus* Txsc genotipo de Texas, 81% con *P. olseni* y 77% con *P. andrewsi.* El porcentaje de cobertura de *P. marinus* aislado de Nayarit con las secuencias de *P. olseni y*

P. chesapeaki fue de 63 y 37% respectivamente. Para la región NTS únicamente se encontró en GenBank una secuencia de *P. marinus* que corresponde al genotipo de Texas.

7.6.3 Análisis filogenético del NTS de *P. marinus*

Mediante el análisis de máxima parsimonia utilizando el método de distancias de HKY, se observó que las secuencias obtenidas a partir del NTS se agruparon en dos clados hermanos (Fig. 15), las secuencias del clado B estuvieron relacionadas con el genotipo de Texas, y para el clado A no se encontró similitud con algún genotipo, lo anterior se debe a la falta de información de la región NTS para otros genotipos. Adicionalmente se observó que los dos clados en los que se agruparon las secuencias de *P. marinus* están separados del clado de *P. olseni*, y todos los clados están separados de *P. chesapeaki*, siendo este último el más lejano.

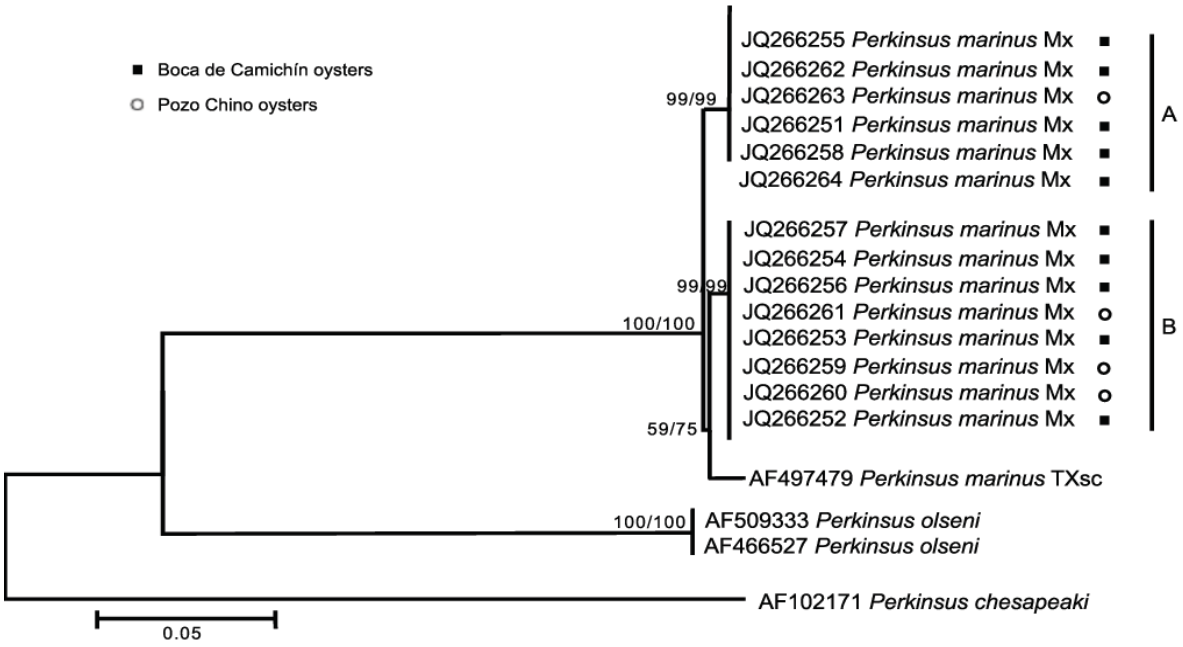


Fig. 15. Árbol filogenético de la región NTS de *P. marinus* de ostiones de Boca de Camichín (■) y Pozo Chino (○). Secuencias analizadas con el algoritmo neighbor–joining y pasimónia basado en el modelo Tamura–3–parameter. Las probabilidades de soporte se muestran en los nodos, la primera cifra índica el valor bootstrap por neighbor–joining seguido del valor de parsimonia. En los clados A y B se incluyen las secuencias de *P. marinus* de Nayarit, México.

7.7 Diversidad nucleotídica

La diversidad nucleotídica en el ITS, que comprende el ITS1–5.8S–ITS2 fue de 0.00326 (Tabla IX), sin embargo, al descomponer los fragmentos del ITS se obtuvo que la diversidad nucelotídica es: 0.00161 en el ITS1, 0.00222 para el 5.8S, y 0.00486 para el ITS2 (Fig. 16). Dentro del ITS la mayor diversidad nucleotídica se presentó en el ITS2 con nueve transiciones, a diferencia del ITS1 que únicamente presentó dos transiciones, sin embargo, al comparar la diversidad de todos los marcadores, se obtuvo que en el NTS se presenta la mayor diversidad nucelotídica (0.00968).

Tabla IX. Diversidad nucleotídica (π), transiciones (si), y transversiones (sv) de las regiones ITS y NTS de *Perkinsus marinus* de los esteros Boca de Camichín (C) y Pozo Chino (P). NS = Número de secuencias analizadas.

Marcador	Sitio	NS	Sitios idénticos	si	sv	R si/sv	π
ITS	C	25	481	18	5	3.6	0.00355
	P	20					0.00315
NTS	C	8	1152	20	10	2	0.0102
	P	6					0.01019

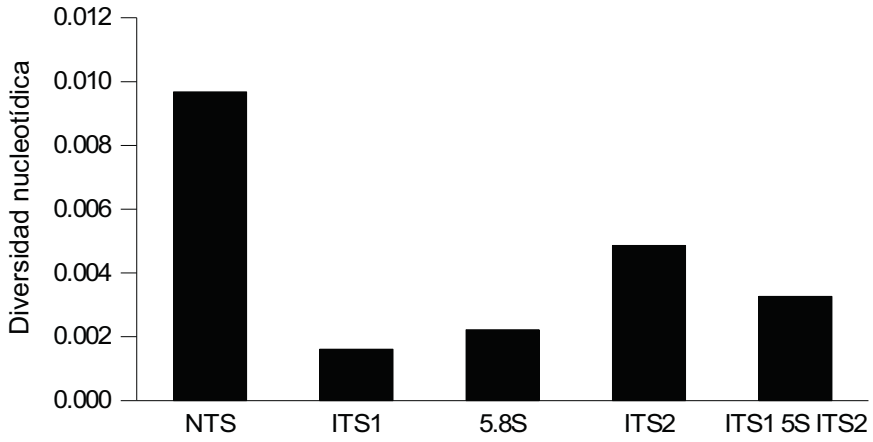


Fig. 16. Diversidad nucleotídica de los marcadores NTS, ITS de *P. marinus* aislado de los esteros de Nayarit, México.

7.8 Cultivo de *P. marinus*

Mediante el diagnóstico por FMT, se obtuvo que de los 11 ostiones de donde se partió para el cultivo de *P. marinus,* presentaron una prevalencia del 100%. De acuerdo con los conteos a partir del crecimiento del patógeno en FMT (Tabla X), se estimó la concentración celular sembrada en cada pozo. La concentración celular más baja se presentó en el organismo 11 con 5.06×10^6 cel/ml, y la mayor infección se obtuvo en el ostión nueve que presentó 51.5×10^6 cel/ml. El cultivo en DME–Ham's F12 fue revisado diariamente bajo microscopio invertido observando las características morfológicas típicas de *Perkinsus* (Fig. 17).

Tabla X. Conteo de *P. marinus* incubado 4 días en FMT a 30°C.

No. de Ostión	Factor de dilución	Conteos por cuadrante	No. de *P. marinus* × 10^6 (cel/ml)	No. de *P. marinus* × 10^6 en1 ml de medio DME
1	10	166, 244, 182, 215	20.175	1.008
2	100	13, 4, 13, 13	12	0.6
3	100	40, 22, 37, 39	34.5	1.725
4	100	38, 28, 28, 31	25	1.25
5	100	33, 18, 28, 35	28.5	1.425
6	100	15, 12, 11, 10	9.6	0.48
7	100	53, 55, 64, 52	44.8	2.24
8	100	19, 24, 21, 28	23	1.15
9	100	47, 36, 36, 87	51.5	2.575
10	100	27, 31, 25, 21	20.8	1.04
11	10	75, 47, 55, 76	5.06	0.253

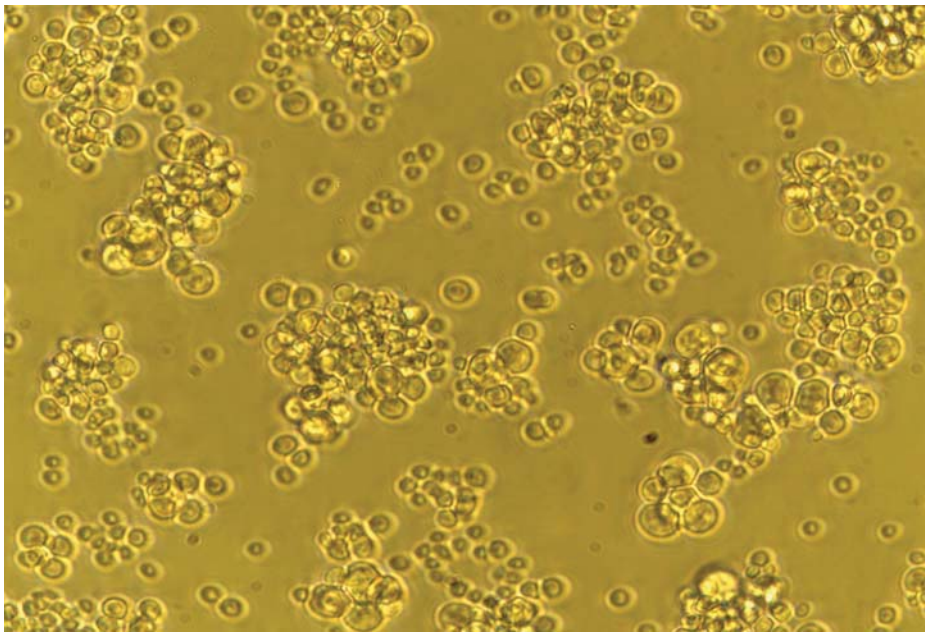


Fig. 17. Cultivo de *P. marinus* en DME–Ham's F12, observado bajo microscopio invertido con objetivo 20X.

7.9 Prevalencia e intensidad de *P. marinus* en *C. corteziensis* de BCS

7.9.1 Identificación de *P. marinus* en *C. corteziensis* cultivado en BCS

La granja de ostiones *C. corteziensis* de BCS, se estuvo monitoreando en diferentes etapas del año previo, sin encontrar *P. marinus.* Sin embargo, los organismos no fueron analizados en verano, y como se muestra en la tabla XI, todos los ostiones del tiempo cero presentaron *P. marinus* en baja intensidad (Tabla XI).

La secuencia del ITS de *P. marinus* de *C. corteziensis* de BCS fue de 638 pb (KJ458987), de las cuales 561 pb fueron analizadas debido a la baja calidad de los extremos secuenciados. La secuencia presentó 100% de identidad con el ITS de *P. marinus* de *C. corteziensis* de Nayarit, México (JQ266240) (Escobedo-Fregoso et al., 2013), el cual fue filogeneticamente agrupado en el clado de *P. marinus* de *C. gigas* de Bahía Kino, Sonora, México, y de *P. marinus* de *C. virginica* de Carolina del Norte, Upper Bay, Maryland, Louisiana y Nueva Jersey, EUA.

7.9.2 Prevalencia de *P. marinus* en *C. corteziensis* cultivado en BCS

La prevalencia de *P. marinus* evaluada mediante PCR fue del 100% en ostiones de BCS (32/32), en ostiones control inyectados con solución salina (22/22), y en ostiones inyectados con *P. marinus* (15/15). Los organismos de BCS cuando el agua estaba a 20°C presentaron intensidades de *P. marinus* entre 1 y 2 (Fig. 18), y cuando los ostiones se sometieron a 26°C durante 15 días, el 68% de los organismos presentaron intensidades de 4, y el 60% de los ostiones inyectados con *P. marinus* presentaron nivel 5 de infección (Fig. 19).

La alta intensidad que presentaron los ostiones sobrevivientes que fueron inyectados con *P. marinus* indica que hubo una alta infección que ocasionó que al segundo día el 43.6% de los ostiones murieran. La mortalidad en organismos inyectados continuó a una menor tasa durante el tiempo, por lo cual se detuvo el ensayo a los 15 días post inyección. La mortalidad acumulada fue de 64.1% en organismos control y 15.4% de mortalidad en organismos inyectados con *P. marinus* (Fig. 20).

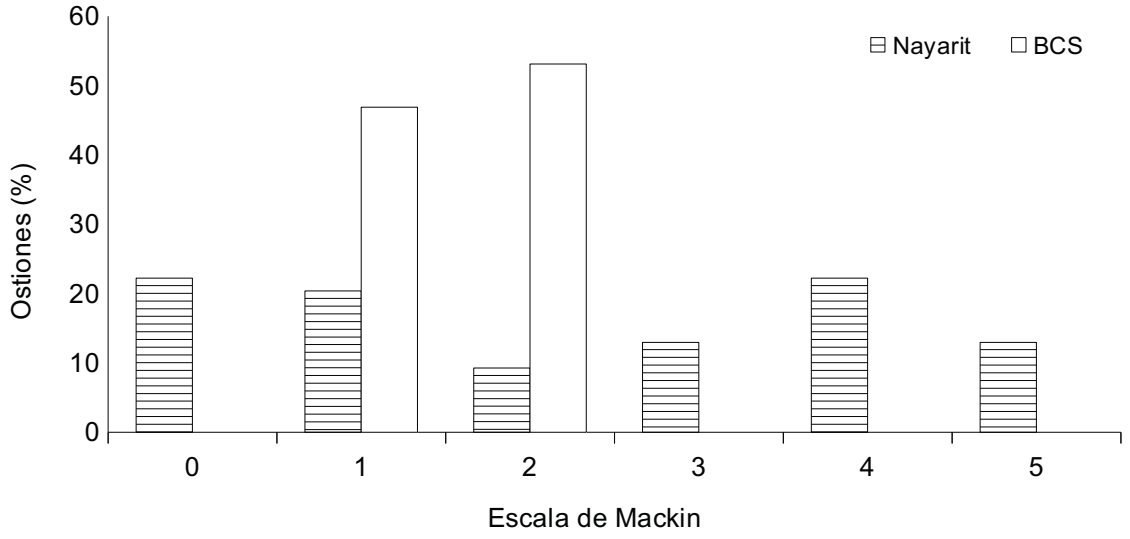


Fig. 18. Porcentaje de ostiones clasificados por niveles de infección por *P. marinus* de acuerdo a la escala de Mackin. Ostiones de Nayarit (*n* = 54) y de BCS (*n* = 32).

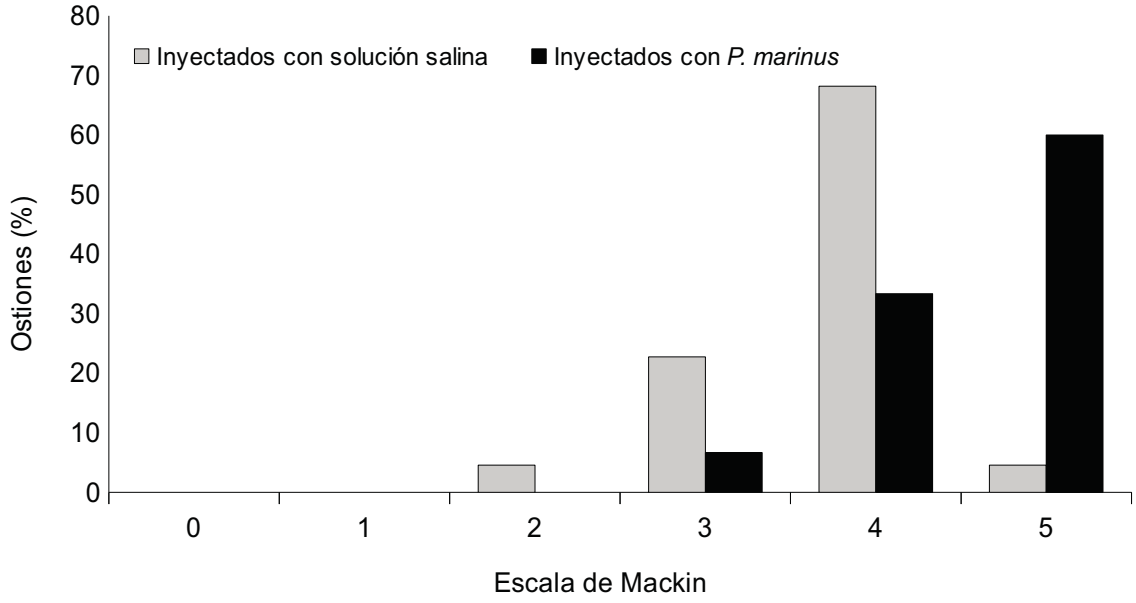


Fig. 19. Porcentaje de ostiones clasificados por niveles de infección por *P. marinus* de acuerdo a la escala de Mackin. Ostiones inyectados con solución salina (n = 22), e inyectados con *P. marinus* (n = 15).

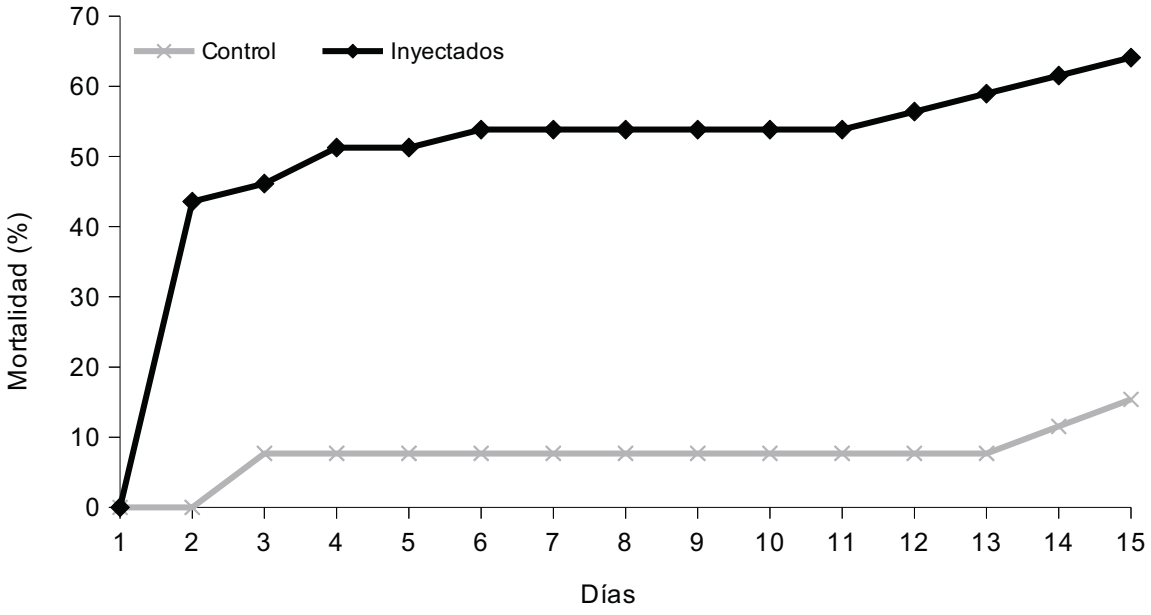


Fig. 20. Porcentaje de mortalidad acumulada en ostiones inyectados con *P. marinus* (línea negra) y de ostiones inyectados con solución salina a los 15 días post inyección (línea gris).

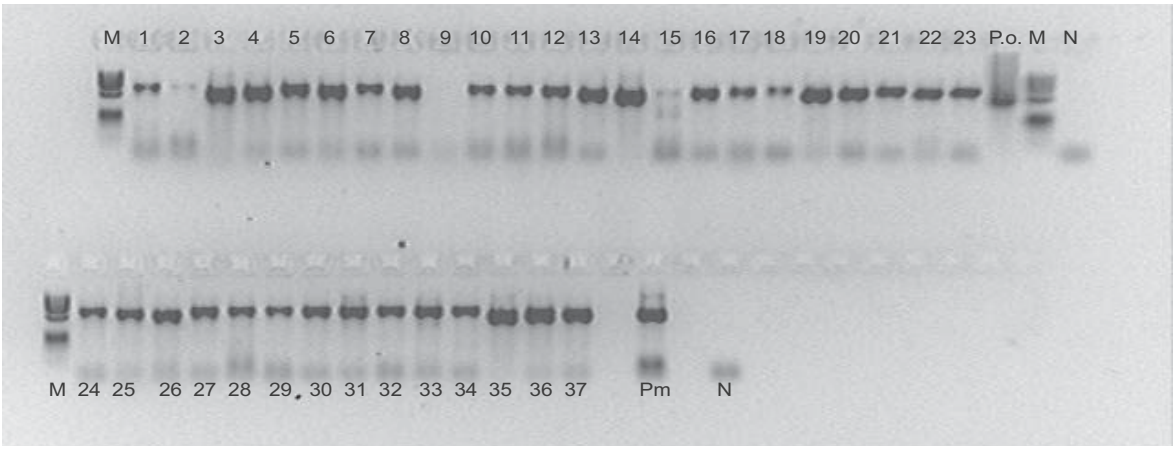


Fig. 21. Amplificación de ~700 pb del ITS de *P. marinus* en branquias de *C. corteziensis* no inoculado (1-22) e inoculado (23-37) con *P. marinus*. Como controles positivos se amplificó el ITS de *P. olseni* (P.o) y *P. marinus* (P.m).

En todos los ostiones experimentales se obtuvo amplificación del ITS (Fig. 21) que corresponde a *P. marinus*. La identificación de la especie de *Perkinsus* fue realizada a partir de la purificación de geles con los fragmentos amplificados del ITS de *Perkinsus* procedentes de los ostiones 05, 06 y 32. La secuencia obtenida fue depositada en GenBank con el número de acceso KJ458987.

Tabla XI. Prevalencia e intensidad de *P. marinus* en *C. corteziensis* de BCS, y en ostiones inyectados con agua marina y con *P. marinus.*

No. ostión	Condición	Trofozoitos/g x10^5	PCR
01-04-12	Tiempo cero	0.087	Positivo
02-04-12	Tiempo cero	0.011	Positivo
03-04-12	Tiempo cero	0.000	Positivo
04-04-12	Tiempo cero	0.003	Positivo
05-04-12	Tiempo cero	0.029	Positivo
06-04-12	Tiempo cero	0.132	Positivo
07-04-12	Tiempo cero	0.000	Positivo
08-04-12	Tiempo cero	0.028	Positivo
09-04-12	Tiempo cero	0.036	Positivo
10-04-12	Tiempo cero	0.042	Positivo
01-05-12	Inyectados con agua salina	10.8	Positivo
02-05-12	Inyectados con agua salina	8.3	Positivo
03-05-12	Inyectados con agua salina	6.3	Positivo
04-05-12	Inyectados con agua salina	2.5	Positivo
05-05-12	Inyectados con agua salina	4.3	Positivo
06-05-12	Inyectados con agua salina	2.6	Positivo
07-05-12	Inyectados con agua salina	6.9	Positivo
08-05-12	Inyectados con agua salina	7.1	Positivo
09-05-12	Inyectados con agua salina	9.2	Positivo
10-05-12	Inyectados con agua salina	6.4	Positivo
11-05-12	Inyectados con agua salina	8.0	Positivo
12-05-12	Inyectados con agua salina	8.9	Positivo
13-05-12	Inyectados con agua salina	26.8	Positivo
14-05-12	Inyectados con agua salina	7.2	Positivo
15-05-12	Inyectados con agua salina	5.4	Positivo
16-05-12	Inyectados con agua salina	12.9	Positivo
17-05-12	Inyectados con agua salina	13.2	Positivo
18-05-12	Inyectados con agua salina	2.1	Positivo
19-05-12	Inyectados con agua salina	6.6	Positivo
20-05-12	Inyectados con agua salina	7.6	Positivo
21-05-12	Inyectados con agua salina	0.6	Positivo
22-05-12	Inyectados con agua salina	5.0	Positivo
23-05-12	Inyectados con *P. marinus*	23.0	Positivo
24-05-12	Inyectados con *P. marinus*	136.2	Positivo
25-05-12	Inyectados con *P. marinus*	80.4	Positivo
26-05-12	Inyectados con *P. marinus*	9.8	Positivo
27-05-12	Inyectados con *P. marinus*	20.3	Positivo
28-05-12	Inyectados con *P. marinus*	10.9	Positivo
29-05-12	Inyectados con *P. marinus*	17.6	Positivo
30-05-12	Inyectados con *P. marinus*	54.6	Positivo
31-05-12	Inyectados con *P. marinus*	8.2	Positivo
32-05-12	Inyectados con *P. marinus*	86.5	Positivo
33-05-12	Inyectados con *P. marinus*	68.5	Positivo
34-05-12	Inyectados con *P. marinus*	7.2	Positivo
35-05-12	Inyectados con *P. marinus*	30.2	Positivo
36-05-12	Inyectados con *P. marinus*	3.9	Positivo
37-05-12	Inyectados con *P. marinus*	18.0	Positivo

7.10 Aproximación transcriptomica de *C. corteziensis* mediante RNA–Seq

7.10.1 Calidad del ARN para secuenciación

La calidad del ARN de branquias de *C. corteziensis* obtenido de una mezcla de ARN de tres ostiones inyectados con agua salina y tres ostiones inyectados con *P. marinus* fue evaluado en gel de agarosa (Fig 22A). La mayoría de las muestras presentaron los dos fragmentos que representan las subunidades ribosomales 20S y 18S que son indicadoras de integridad del ARN. En general se espera que la relación 28S:18S sea 2:1 (Fig. 22B), sin embargo, las muestras no presentaron esta relación. Esta carencia de relación ha sido obtenida en diversos invertebrados (Winnebeck, Millar, Warman 2010). No se observaron barridos del ARN en las 6 muestras, como se muestran en la figura 22B que indiquen degradación del ARN, considerando que el ARN de las 6 muestras presentaron la integridad requerida para secuenciación.

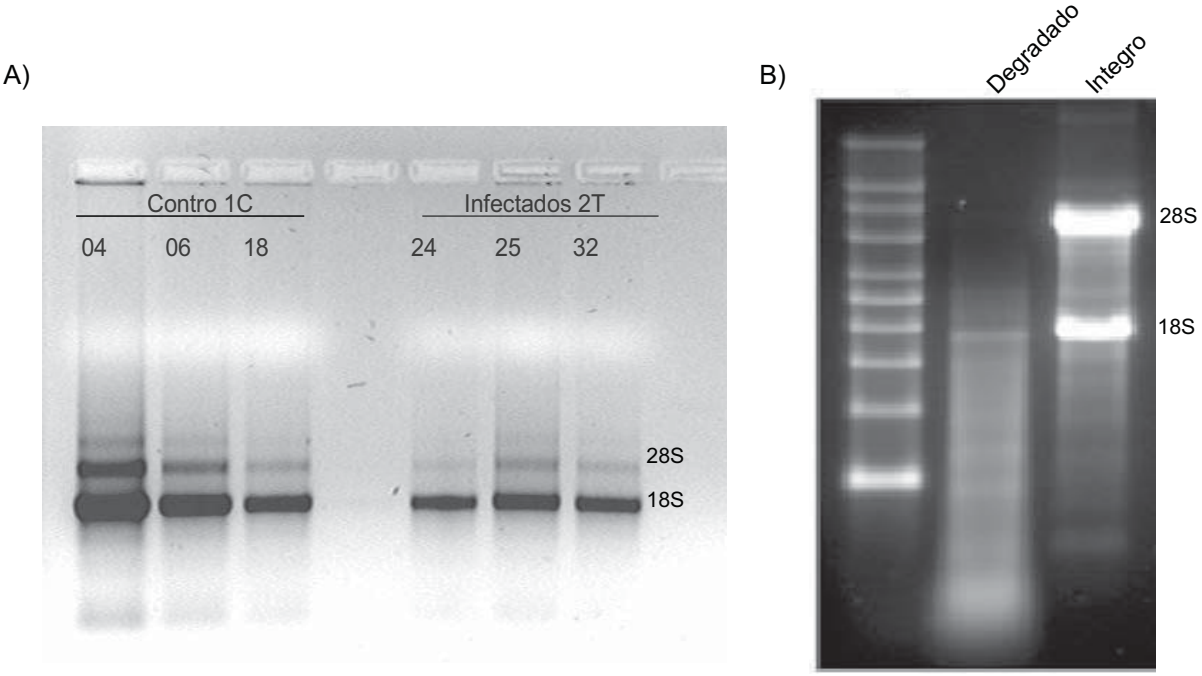


Fig. 22. (A) Electroforesis en gel de agarosa que muestra la integridad del ARN (5µl) de branquias de tres ostiones (04, 06 y 08) *C. corteziensis* inyectados con agua salina (control 1C) y de tres ostiones (24, 25 y 32) inyectados con *P. marinus* (2T). Ejemplo de electroforesis del RNA de un organismo modelo en donde se observa la degradación de ARN y la relación 2:1 del 28S:18S (B).

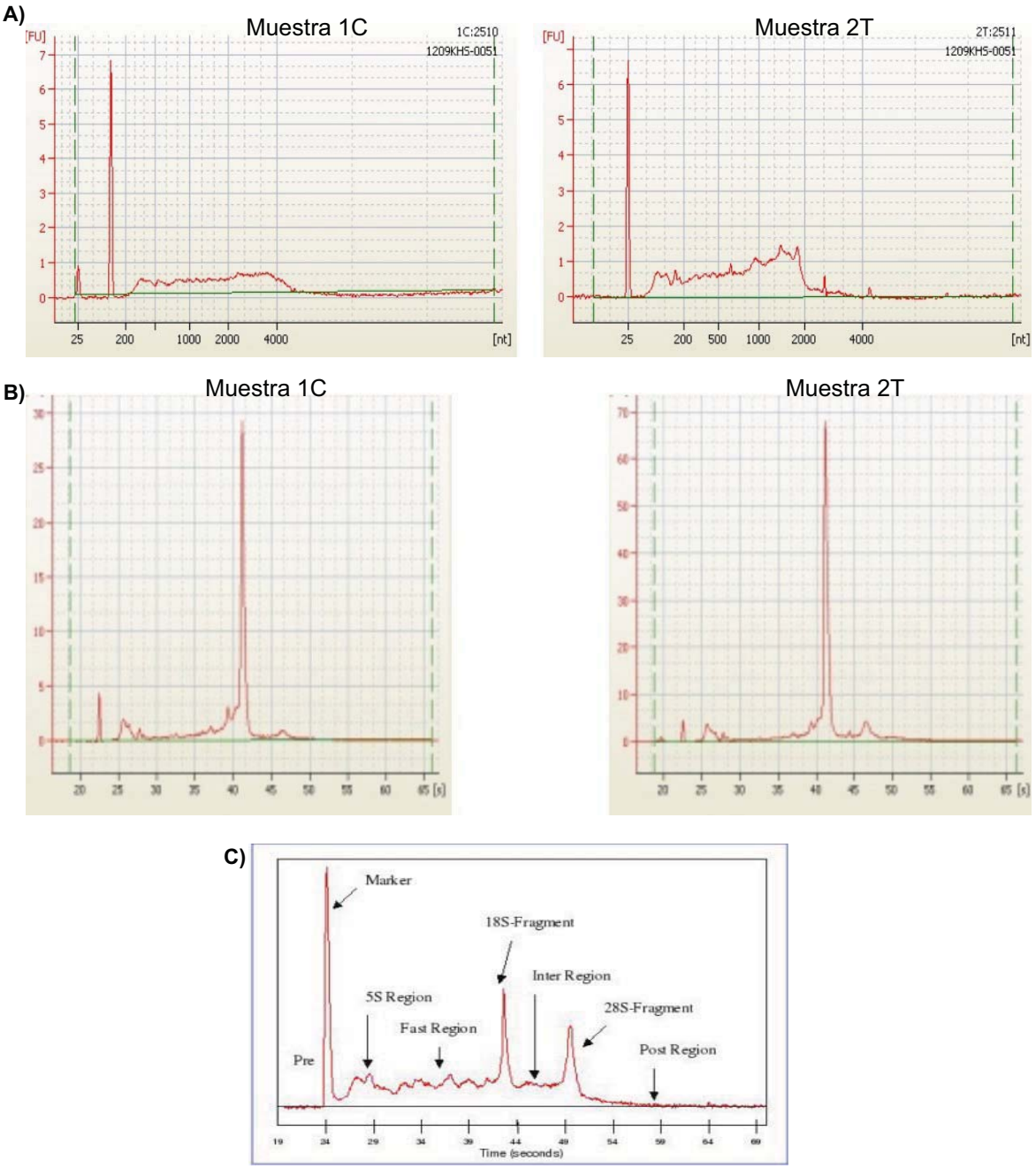


Fig. 23. Electroferogramas del ARN degradado de las muestras 1C y 2T del primer envío (A) y electroferogramas del ARN integro para las muestras del segundo envío. Patrón e Electroferograma modelo para evaluar el RIN del ARN (C).

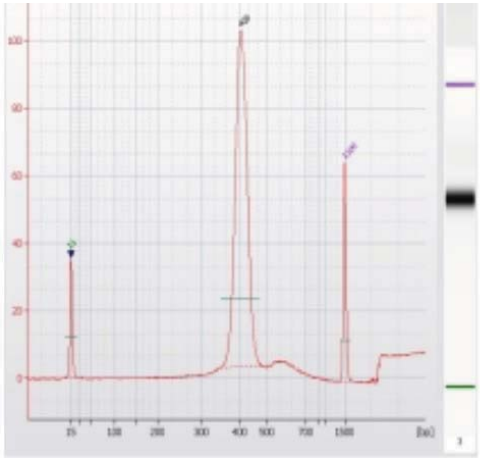
Los electroferogramas de la figura 23A muestran fragmentos en un tiempo bajo, a diferencia de los electroferogramas de la figura 23B que muestran una alta cantidad de ARN al minuto 40, el cual es común del 18S (Fig. 23C), indicando una buena integridad del ARN de las muestras del segundo envió que tuvieron un valor de RIN de 8.3 y 9, siendo 8 el RIN (RNA *integrity number*) (Schroeder et al., 2006) mínimo requerido para ser secuenciado (Tabla XII).

Tabla XII. Evaluación de la integridad del ARN de las muestras para secuenciación RNA–Seq. RIN (número de integridad del ARN).

	Nombre de la muestra	Concentración (ng/µl)	Volumen	Cantidad total (µg)	RIN	Radio ARNr	Resultado
Primer envío	1C	16.76	35	0.59	2.2	0	No aceptable
	2T	25.22	35	0.88	2	0	No aceptable
Segundo envío	1C	89	24	2.14	8.3	0	Aceptable
	2T	100	24	2.4	9	0.1	Aceptable
	Requisitos	100	10	1	Mayor a 8		

De acuerdo a los electroferogramas de las dos librerías realizadas por Macrogen (Fig. 24), presentaron fragmentos de 405 pb para la librería de la muestra 1C y de 432 pb para la librería de la muestra 2T (Tabla XIII), siendo un tamaño aceptable para ser secuenciado. Para que las librerías fueran aceptables se esperaba tener fragmentos de 400 pb para secuenciar 100 pb de cada extremo (paired–end) y tener una distancia conocida de 200 pb, información necesaria para realizar el ensamblaje de las lecturas.

Librería 1C



Librería 2T

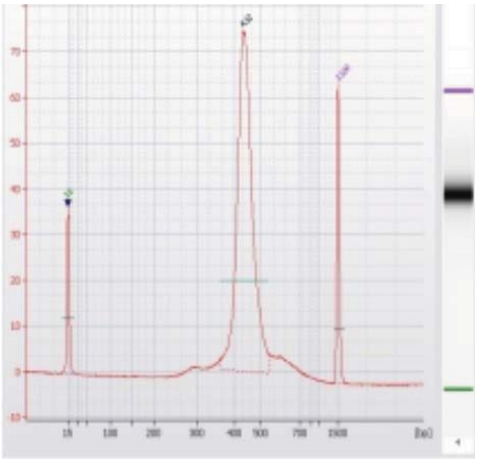


Fig. 24. Electroferogramas de las librerías de las muestras 1C y 2T.

Tabla XIII. Tamaño de los fragmentos de las dos librerías de ARN.

Nombre de la muestra	Tipo de librería	Concentración (ng/µl)	Concentración (nM)	Tamaño (pb)	Resultado
1C	RNA	44.92	170.63	405	Aceptable
2T	RNA	27.05	96.33	432	Aceptable

El número de lecturas que se muestran en la tabla XIV corresponden a dos secuenciaciones por cada librería debido a que fueron secuenciados con el método paired–end que secuencia ambos extremos. Se obtuvieron aproximadamente 6 G de información para cada librería, teniendo un total de 12 G de información que equivalen a 133, 814,590 de lecturas de 101 pb de longitud. La calidad del 95% de las lecturas presentaron calidades de Q20 que indica que la probabilidad del error de cada base es 1 en 100 pb, y un 89% presentó calidades de Q30 que indica que el error de cada base es de 1 en 1,000 pb. El porcentaje de bases ambiguas fue bajo y el contenido de guaninas–citocinas fue del 40% (Tabla XIV), indicando que las lecturas tiene buena calidad y no hay sobre–representación de bases nucleotídicas.

Tabla XIV. Número de lecturas paired–end obtenidas de la secuenciación RNA–seq Illumina Hiseq 2000.

Librería	Bases totales	Conteo de lecturas	N (%)	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
1C	6,815,866,830	67,483,830	0.004	40.63	95.69	89.73
2T	6,699,406,760	66,330,760	0.004	40	95.32	89.13

7.10.2 Verificación de la calidad de las lecturas obtenidas por secuenciación RNA–Seq

A continuación se muestran únicamente los resultados de la secuenciación de una librería en un solo sentido, debido a que las cuatro secuenciaciones presentaron resultados similares en la calidad de secuencias.

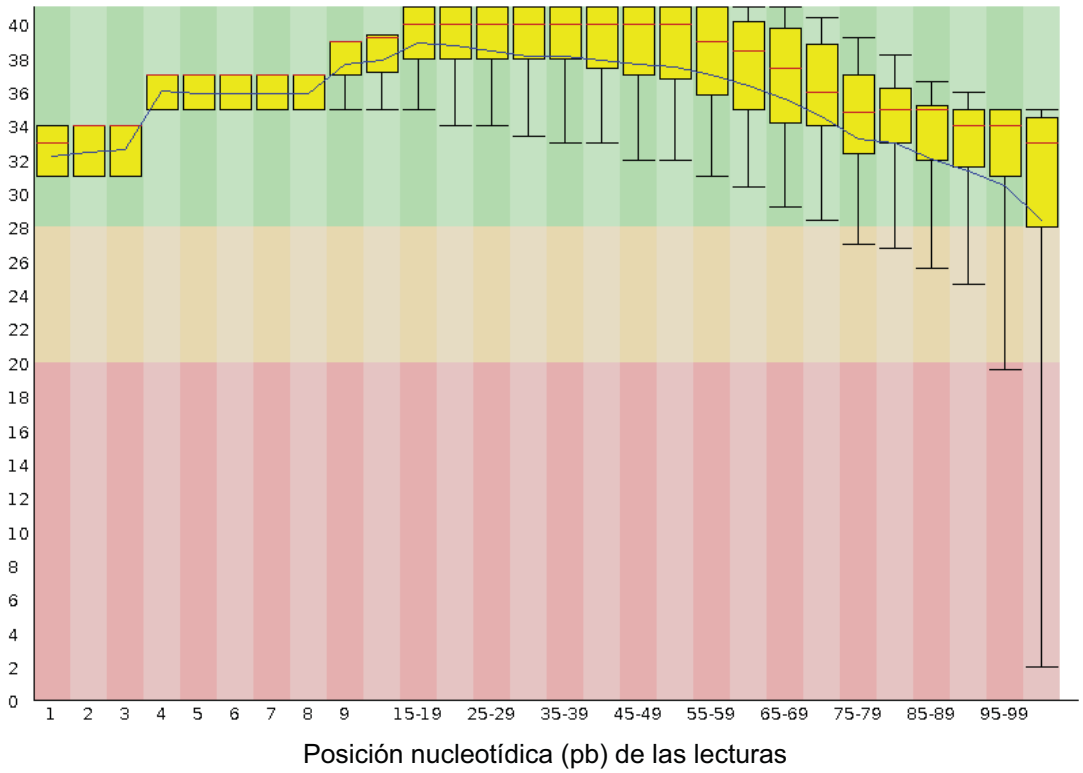


Fig. 25. Calidad de las lecturas por posición nucleotídica (eje X) evaluado mediante el valor Q (eje Y). La calidad de la posición nucleotídica está indicada por las barras y las líneas indican la desviación estándar.

Los valores medios de la calidad (línea azul) y la mediana (línea roja) de las lecturas estuvieron representadas en la zona verde con valores Q entre 28–40, indicando buena calidad. En las posiciones 99–101se observa que la desviación estándar del valor Q es menor a 20, indicando que hay lecturas con mala calidad en las ultimas bases (Fig. 25), siendo necesaria la eliminación de esta base porque de acuerdo al programa FastQC, este valore indica mala calidad.

Como se muestra en la figura 26, la longitud de los ~33 millones de lecturas por sentido fue de 101 pb , y no se presentaron nucleótidos ambiguos (N) a lo largo de los 101 pb (Fig. 27).

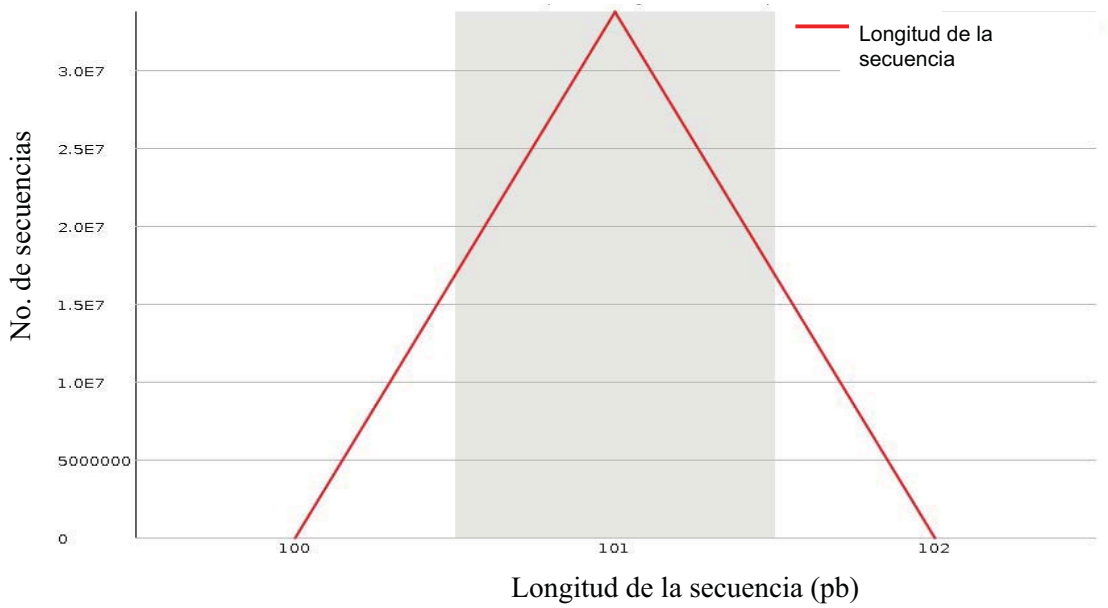


Fig. 26. Distribución de la longitud (pb) de las lecturas obtenidas por secuenciación RNA–Seq.

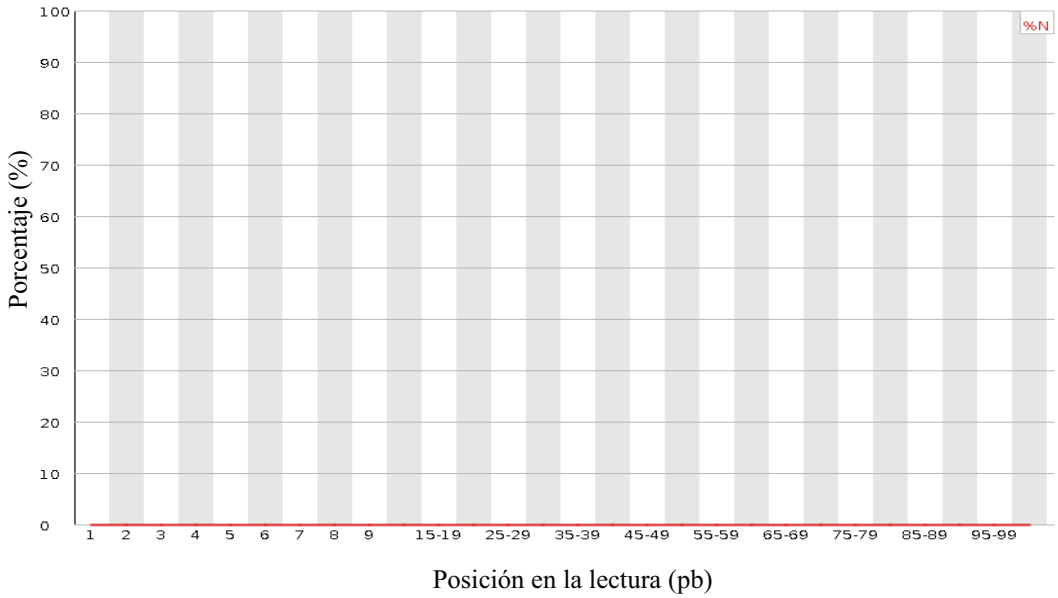


Fig. 27. Porcentaje de nucleótidos ambiguos (eje Y) por posición nucleotídica (eje X).

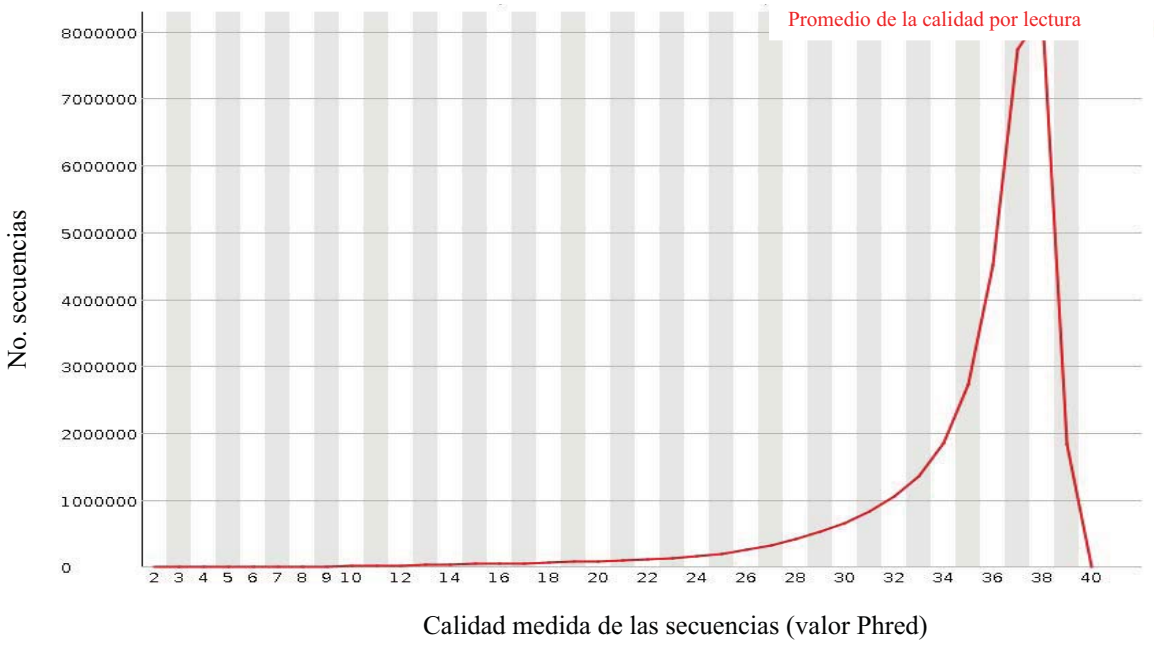


Fig. 28. Distribución de la calidad de las secuencias, en donde se presentan la media de la calidad (Q) del número de secuencias (eje y).

La calidad (Q) de las secuencias presentó una sola distribución con valores medios de 37, indicando que la mayoría de las secuencias presentaron buena calidad (Fig. 27). Secuencias con más de una distribución y con valores menores a 20, indicarían problemas de calidad. De acuerdo al contenido de GC (Fig. 28), se observó que las secuencias presentaron un patrón similar (línea roja) al patrón esperado (línea azul). Cuando la suma de las desviaciones es mayor al 30% de la distribución esperada, indica una posible contaminación de la librería o pudiera ser una librería no aleatoria.

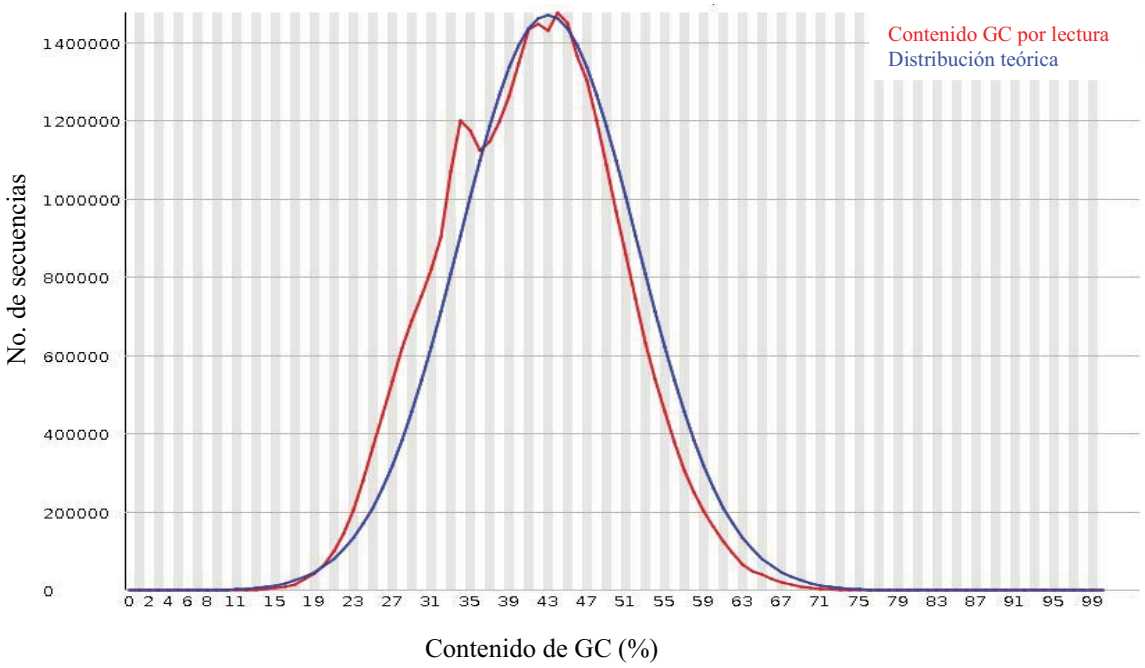


Fig. 29. Distribución del contenido de GC de las lecturas (línea roja) comparadas con la distribución teórica esperada(línea azul).

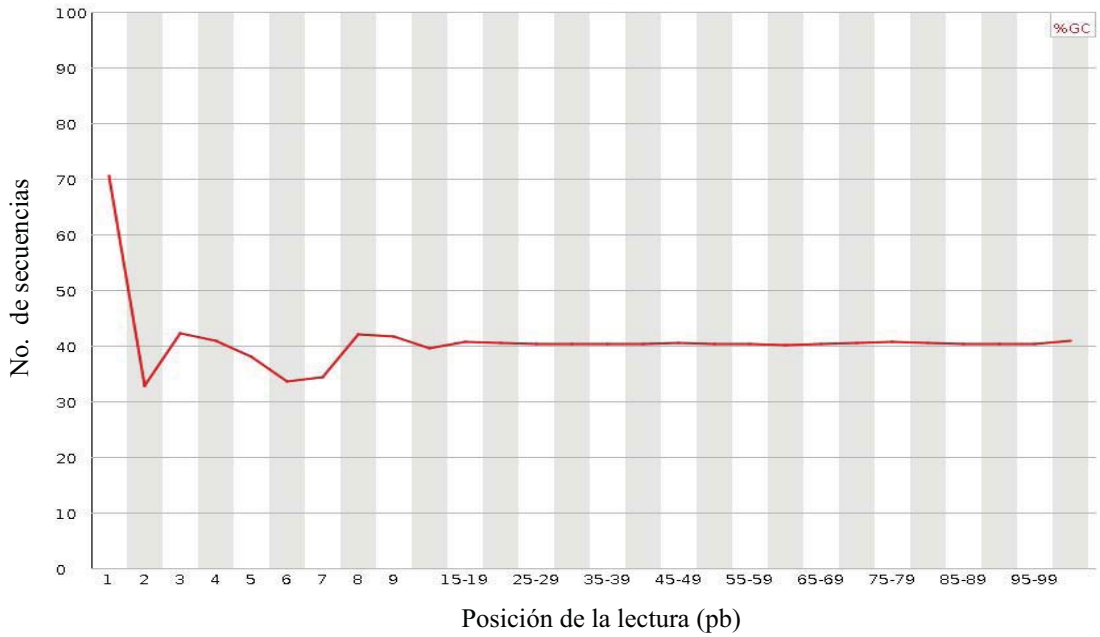


Fig. 30. Distribución del contenido de GC por posición nucleotídica.

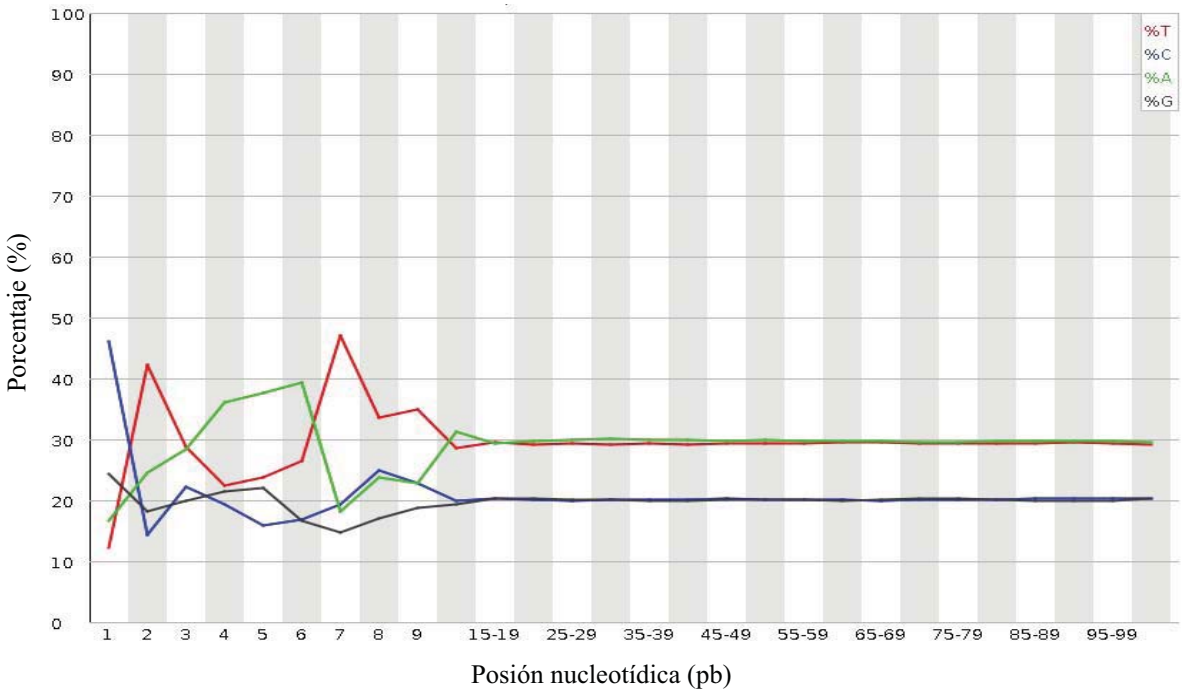


Fig. 31. Distribución del porcentaje del contenido de bases por posición nucleotídica.

El contenido de GC (Fig. 30) presentó diferencias mayores del 10% en las primeras 10 posiciones, en una librería ideal no se presentan variaciones de GC mayores al 5%, al analizar el contenido de las cuatro bases (Fig. 31) se observa que en las primeras 10 posiciones hay variaciones de más del 20% entre bases, esta variación debería de ser del 10% como máximo. En la mayoría de las posiciones se presenta un alto porcentaje de adenina y timina, lo que indica que en las primeras bases se encuentra el poly–A, el cual deberá de ser eliminado. Con un análisis preliminar con Perl se verificó el contenido de poly–A en las librerías, por lo que fue necesario eliminar secuencias con alto contenido de poly–A.

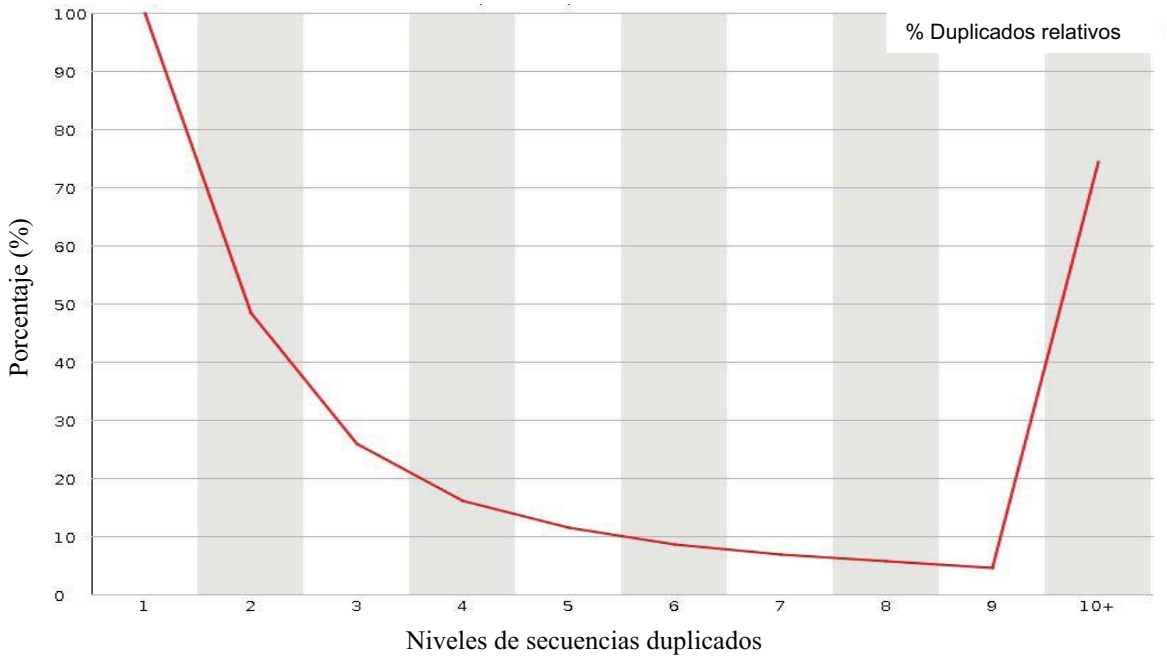


Fig. 32. Niveles de duplicación de secuencias.

Se obtuvo un nivel alto de secuencias duplicadas (Fig. 32), lo cual puede indicar que hubo una sobre secuenciación o transcritos sobre–representados, sin embargo, el programa FastQC únicamente analiza 200,000 secuencias. En un panorama ideal, el nivel 1 debería de ser 100% y decaer en los siguientes niveles a cero. Los motivos de duplicación de secuencias pueden presentarse por contaminación con adaptadores, baja diversidad de transcritos, sobre secuenciación de las librerías, y/o sobre amplificación de ciertos transcritos al momento del enriquecimiento por PCR.

Como se muestra en la tabla XV se presentaron transcritos sobre–representados con alta similitudes a los transcritos comúnmente abundantes como el citocromo c oxidasa. FastQC indica como secuencias sobre–representadas, cuando el contenido de lecturas sobrepasan el 0.1%.

Tabla XV. Secuencias sobre representadas.

Secuencias sobrerepresentadas	%	Similitud	E value	% cobertura
CTTAAAGGCATTTTTCGAACAACCAGCTATCATAAAACTCGATTTTGCGT	0.21	*Crassostra* sp. DB1 mitocondrion (citocromo c oxidasa 1	5.00E-009	84
CAATTTTAAAACTTTTTATAGGCGTAGTATAGGACTACTAGAAACGTCAT	0.20	No hit		
TATGAGTCCAATTTTAAAACTTTTTATAGGCGTAGTATAGGACTACTAGA	0.20	No hit		
GTCCAATTTTAAAACTTTTTATAGGCGTAGTATAGGACTACTAGAAACGT	0.15	No hit		
CCAATTTTAAAACTTTTTATAGGCGTAGTATAGGACTACTAGAAACGTCA	0.14	No hit		
CTGCACTTAAAGGCATTTTTCGAACAACCAGCTATCATAAAACTCGATTT	0.13	*Crassostra* sp. DB1 mitocondrion (citocromo c oxidasa 1)	5.00E-012	94
GGCAAATTCAGGCCCCGCCTGTTTAACAAAAACATCGCTAAAAGTACCTG	0.11	*Crassostrea rizhophorae* 16S	3.00E-016	92
CGTAAAGCTGCACTTAAAGGCATTTTTCGAACAACCAGCTATCATAAAAC	0.11	*Crassostrea angulata* mitocondrion (cyt)	1.00E-012	96

Se obtuvo un ensamblaje preliminar *de novo* del transcriptoma de *C. corteziensis* con el ensambaldor Trinity, sin embargo, no se realizó el mapeo por librerías, por lo tanto únicamente se presentan en este documento los resultados de lecturas ensambladas con CLC. Las lecturas obtenidas por secuenciación masiva verificadas de calidad, fueron incorporadas al ensamblador CLC, obteniendo lecturas ensambladas denominadas *contigs.* Del ensamblaje de las dos librerías se obtuvo un total de 105,212 *contigs,* en donde el 50% de los *contigs* tienen una longitud media de 918 pb (N50), y el 25% tienen una longitud media de 1,895 pb (Tabla XVI).

Tabla XVI. Número de contigs ensamblados con CLC.

Resultados del ensamble	Longitud de *contigs*
N75	415
N50	918
N25	1895
Longitud mínima de los *contigs*	200
Longitud máxma de los *contigs*	10245
Longitud media de los *contigs*	640
Número total de *contigs*	105215

7.11 Anotación del transcriptoma de *C. corteziensis*

De los 105,212 *contigs* se anotaron 15,663 (Fig. 33) secuencias que corresponden al 14.88%. De especie que se obtuvo el mayor numero de blast *hits* fue el ostión *C. gigas* seguido del poliqueto *Capitella teleta,* y la especie marina con la que mayor se obtuvo anotación después de *C. gigas* fue el erizo *Stronglylocentrotus purpuratus* (Fig 34). El mayor término ontológico fue el proceso de oxido-reducción en el que interviene genes que participan en la respiración, seguido del transporte transmembranal. Los principales procesos biológicos de respuesta inmune en el transcriptoma de *C. cortezieneis* fueron: regulación positiva y negativa de procesos apoptoticos y procesos de proliferación celular (Fig. 35).

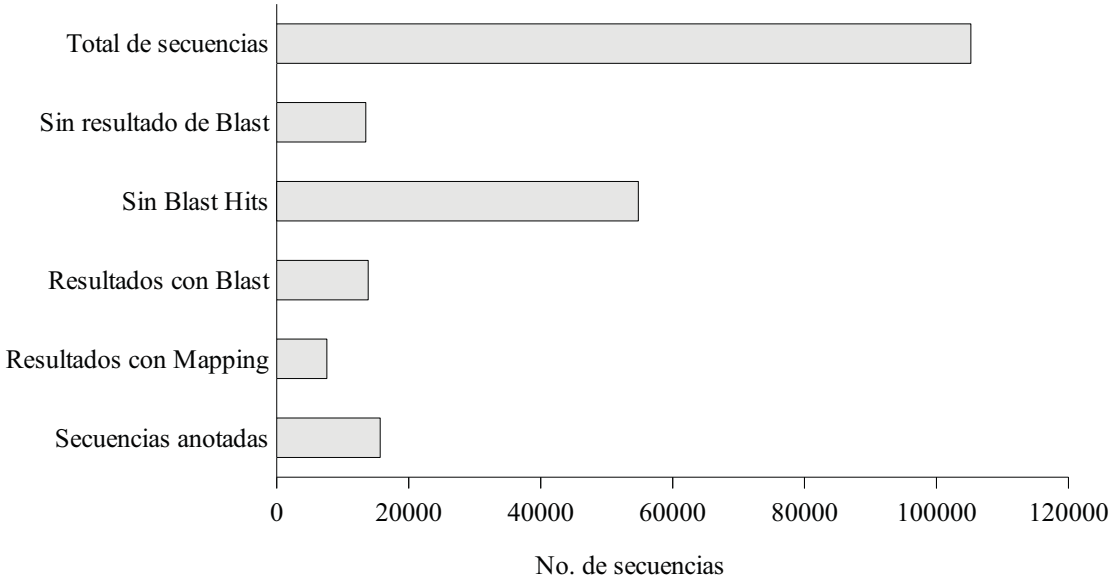


Fig. 33. Número de secuencias con Blast *hits* y anotadas con Blast2Go, del ensamblaje del transcriptóma de *C. corteziensis.*

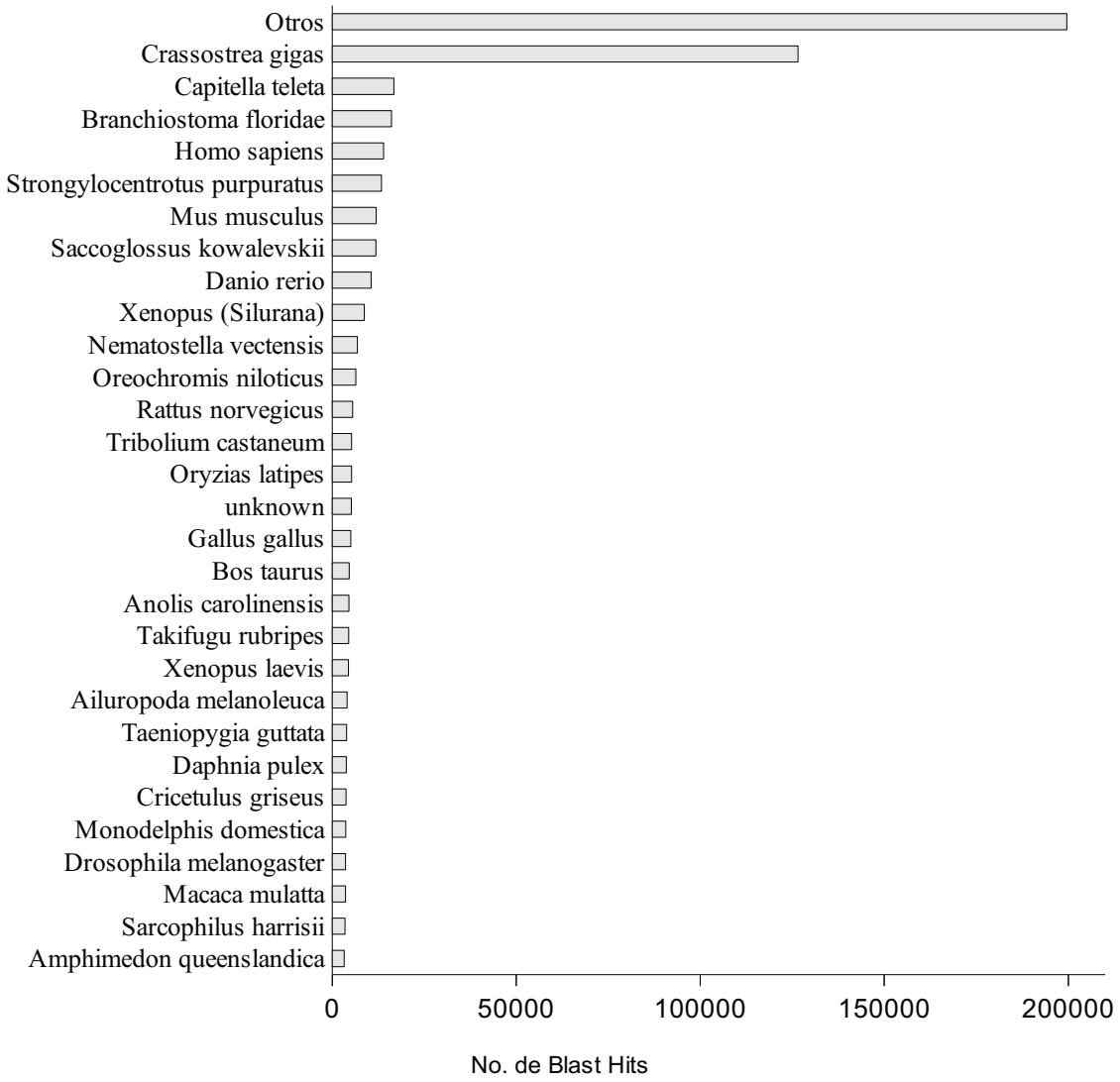


Fig. 34. Número de Blast *hits* por especie obtenidas para el ensamblaje del transcriptóma de *C. corteziensis.*

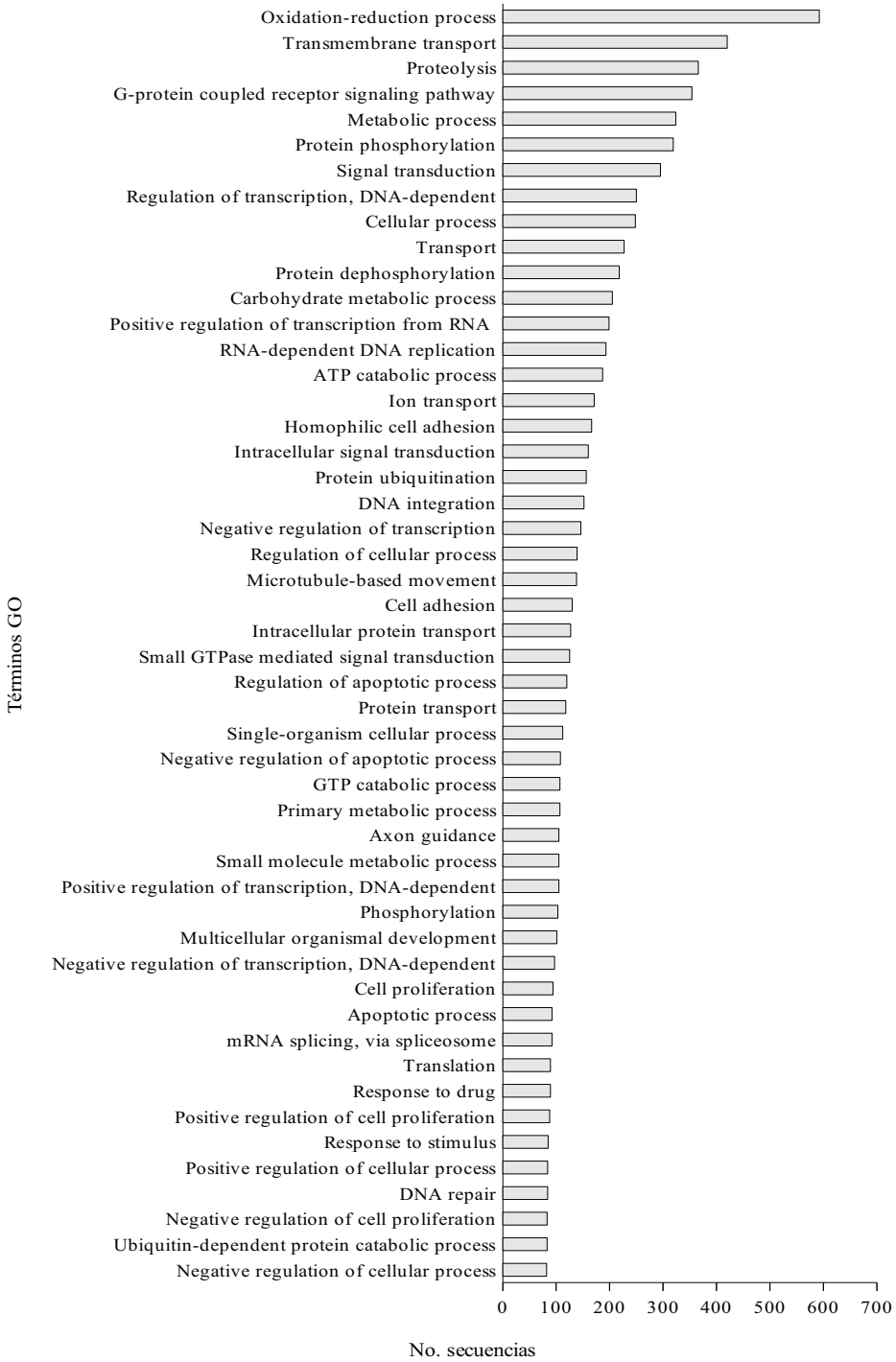


Fig. 35. No. se secuencias clasificadas por términos ontológicos de acuerdo al proceso biológico al que pertenecen las secuencias del transcriptóma de *C. corteziensis.*

7.12 Selección de potenciales candidatos a ser genes de referencia

De los 15,136 genes impresos en el microarreglo de *D. melanogaster*, se obtuvo que el porcentaje de genes que no presentaron diferencias en la expresión de transcritos de *C. corteziensis* (Z–score < 1) entre las infecciones clasificadas como bajas (LI) y altas (HI) fue del 54.4% para el arreglo A, 65.6% para el arreglo B y 61.4% para el arreglo C. De los genes con Z–score < 1 se eligieron los procesos considerados como estables, encontrando que de los tres microarreglos los genes con potencial para ser utilizados como genes de referencia fueron entre 123 y 144 genes ribosomales, de 32 a 33 genes del citoesqueleto y de 111 a 136 genes que participan en la elongación (Tabla XVII). De los genes clasificados en las tres ontologías anteriores se obtuvieron por medio de un diagrama de Venn, 161 genes comunes entre los tres microarreglos (Fig. 36). Adicional a los 161 genes compartidos entre las tres condiciones, 54 genes se comparten entre organismos del arreglo A y B, siendo mayor a los 11 genes que comparten los organismos del arreglo A y C que representan ostiones de Nayarit respecto a los ostiones experimentales. Sin embargo, ostiones del medio natural de Nayarit y BCS compartieron 40 genes, sugiriendo que los genes que no presentan expresión diferencial (Z–score < 1) en las tres ontologías, son similares entre los dos sitios de cultivo de ostiones (Fig. 32).

Tabla XVII. Número de genes con Z–score < 1 identificados en tres microarreglos analizados con *C. corteziensis* con diferentes niveles de infección por *P. marinus* y bajo diferentes condiciones.

Arreglo	No. genes Z–score < 1	No. de genes ribosomales	No. de genes del citosqueleto	No. de genes de elongación	No. de genes comunes
A	8237	123	32	111	
B	9931	144	33	136	161
C	9295	127	33	125	

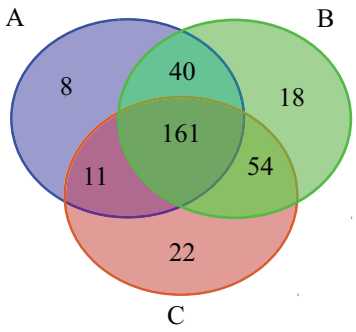


Fig. 36. Número de genes comunes (Z–score < 1) entre los arreglos A, B, y C, hibridizados con *C. corteziensis* con diferentes niveles de infección por *P. marinus.*

Debido a la nula información transcriptómica para *C. corteziensis*, los genes de *D. melanogaster* fueron buscados por homología con blastX en la base preliminar de información transcriptómica de *C. corteziensis* generada en este estudio. El análisis de similitud mostró que los mejores hits para los genes de referencia de *C. corteziensis* fueron con *Drosophila sechellia*, *Drosophila melanogaster*, *Ostrea edulis* y *Crassotrea ariakensis*, a diferencia de los genes de respuesta inmune en donde la mayoría mostraron los mejores hits con *Crassostrea gigas*. Considerando que la función ontológica entre *D. melanogaster* y los hits encontrados para *C. corteziensis* está relacionada. De los ocho genes candidatos para ser genes de referencia de branquias de *C. corteziensis* con diferentes niveles de infección por *P. marinus*, únicamente se obtuvieron curvas estándares de qPCR con eficiencias entre el 92 y 100% para cinco genes de referencia, descartando a las tubulinas y el factor de elongación debido a que las curvas estándares no presentaron buenas eficiencias, lo cual puede deberse a que los iniciadores diseñados no presentan las características óptimas para realizar una amplificación adecuada, la baja eficiencia para las tubulinas puede estar relacionada con el alto contenido de isoformas que presenta el gen, siendo complicado el diseño específico por isoforma.

7.13 Verificación de la calidad del ARN, eliminación de ADN y retrotranscripción

La electroforesis para la verificación de la extracción de ARN de branquias de dos ostiones *C. corteziensis* y *C. gigas* mostraron los fragmentos 28S y 18S (Fig. 37), aunque el radio de los fragmentos no fue como en la mayoría de los vertebrados en donde la relación 28S:18S es 2:1, es común que en ostiones y camarones que se observe únicamente el 18S. Con la no amplificación de *ACT–β* en ARN se verificó la eliminación de ADN genómico (Fig. 38) y con la amplificación de *ACT–β* se corroboró la retrotranscripción de ARN a ADNc. Para todas las muestras analizadas es este estudio, se realizaron las verificaciones anteriormente mencionadas.

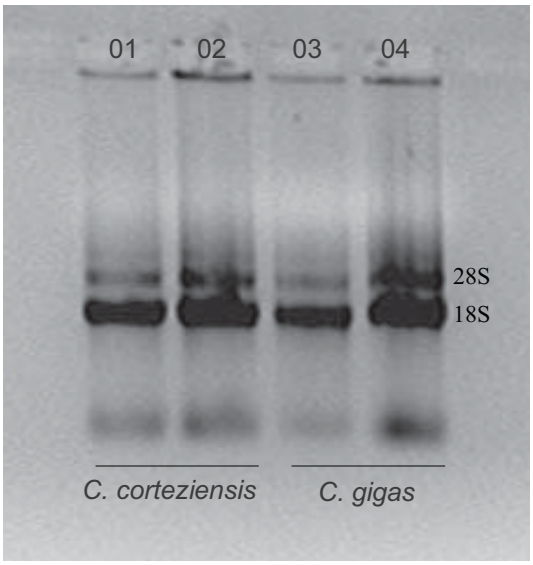


Fig. 37. Evaluación de la integridad del ARN (5µl) de branquias de *C. corteziensis* (01 y 02) y *C. gigas*.

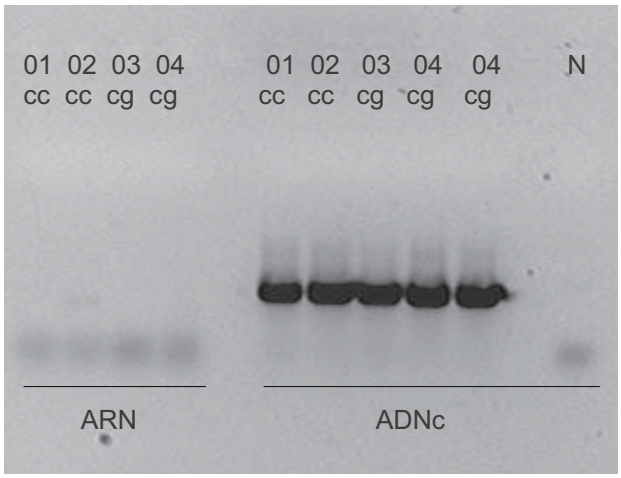


Fig. 38. Evaluación de la eliminación de ADN genómico en el ARN de branquias de *C. corteziensis* con (cc) y *C. gigas* (cg), y evaluación de la retrotranscripción a ADNc mediante la amplificación del gen *ACT–β*.

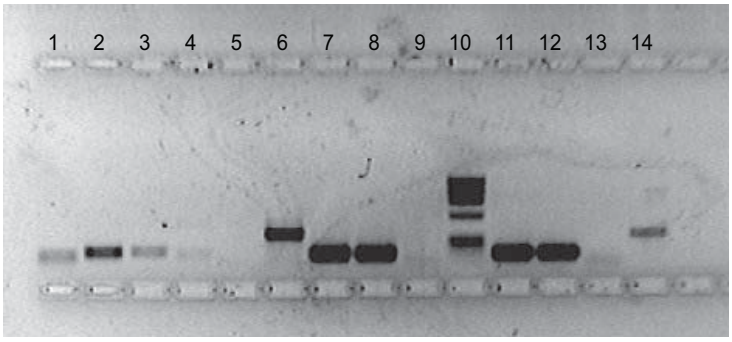


Fig. 39. Amplificación de genes de referencia para *C. corteziensis*. Amplificaciones a 55°C de: tubulina beta (1), factor de elongación (2), tubulina alfa (3), tubulina gama (4), actina (5), control positivo de iniciadores (6), ribosomal L8 (7, 8), control negativo (9), marcador peso molecular (10) y amplificaciones a 60°C de los genes: ribosomal L8 (11, 12), control negativo (13) y control positivo (14).

Con excepción a la actina, todos los iniciadores amplificaron el fragmento de la longitud esperada a 55°C (Fig. 39). Debido a que el cebador para actina no amplificó a ninguna temperatura, se prosiguió con un nuevo diseño de iniciadores para el transcrito específico *ACT–β* (Tabla XVIII). Como se muestra en la figura 5, todos los genes incluyendo el nuevo iniciador para *ACT–β* amplificaron por PCR punto final a 60°C (Fig. 40).

Tabla XVIII. Características de los iniciadores para *ACT–β* de *C. corteziensis*.

Nombre del gen	Contig *C. Corteziensis*	Cebador	Fragmento pb	Long	Tm °C	% GC	Estructura secundaria	Dimeros	Harpin	Delta G	Self dimer	Heterodimero
Beta actina	contig 856	B_actina_F	145	19	63.99	57.89	weak	no	33.7	-3.61		-6.14
		B_actina_R		21	63.9	57.14	no	no	19.6	-3.14		

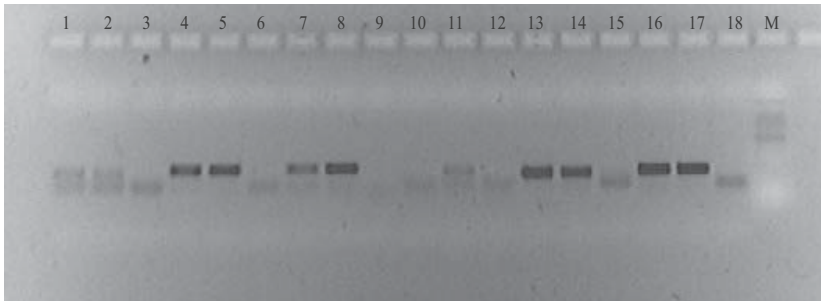


Fig. 40. Amplificación de genes de referencia de *C. corteziensis* por PCR punto final a 60°C. Tubulina beta (1,2), control negativo (3), factor de elongación (4, 5), control negativo (6), tubulina alfa (7, 8), control negativo (9), tubulina gama (10, 11), control negativo (12), beta-actina (13, 14), control negativo (15), ribosomal L8 (16, 17), control negativo (18).

7.14 Estabilidad de genes de referencia

Los cuatro programas utilizados para el análisis de estabilidad de los genes de referencia, arrojaron que *RPL10* y *GAPDH* fueron los genes más estables, seguido de *RPL8* (Fig. 41). El gen *ACT–β* fue el menos estable, lo cual fue corroborado con el análisis de expresión entre grupos experimentales evaluados por qPCR, obteniendo que el grupo C3 presentó la mayor expresión de *ACT–β* respecto C4, I4 e I5. De acuerdo con el análisis de estabilidad los genes *RPL10*, *GAPDH* y *RPL8* fueron consideraros como genes de referencia, utilizando la media geométrica de los tres genes para normalizar los datos de expresión relativa.

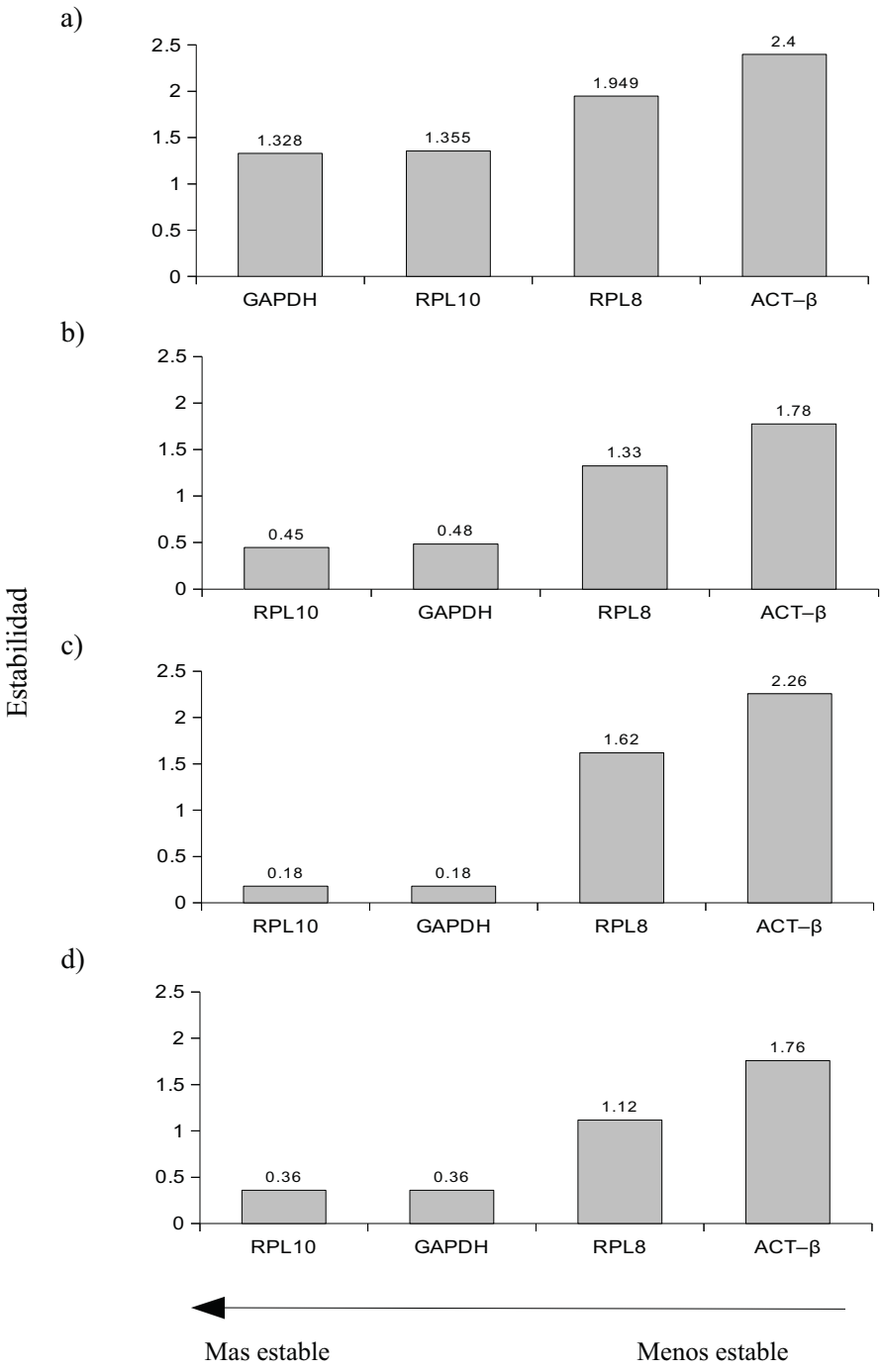


Fig. 41. Estabilidad de genes de referencia calculadas con los métodos Delta CT(a), BestKeeper (b), Normfinder (c), y Genorm (d).

7.15 Identificación de procesos biológicos de *C. corteziensis* infectado por *P. marinus*

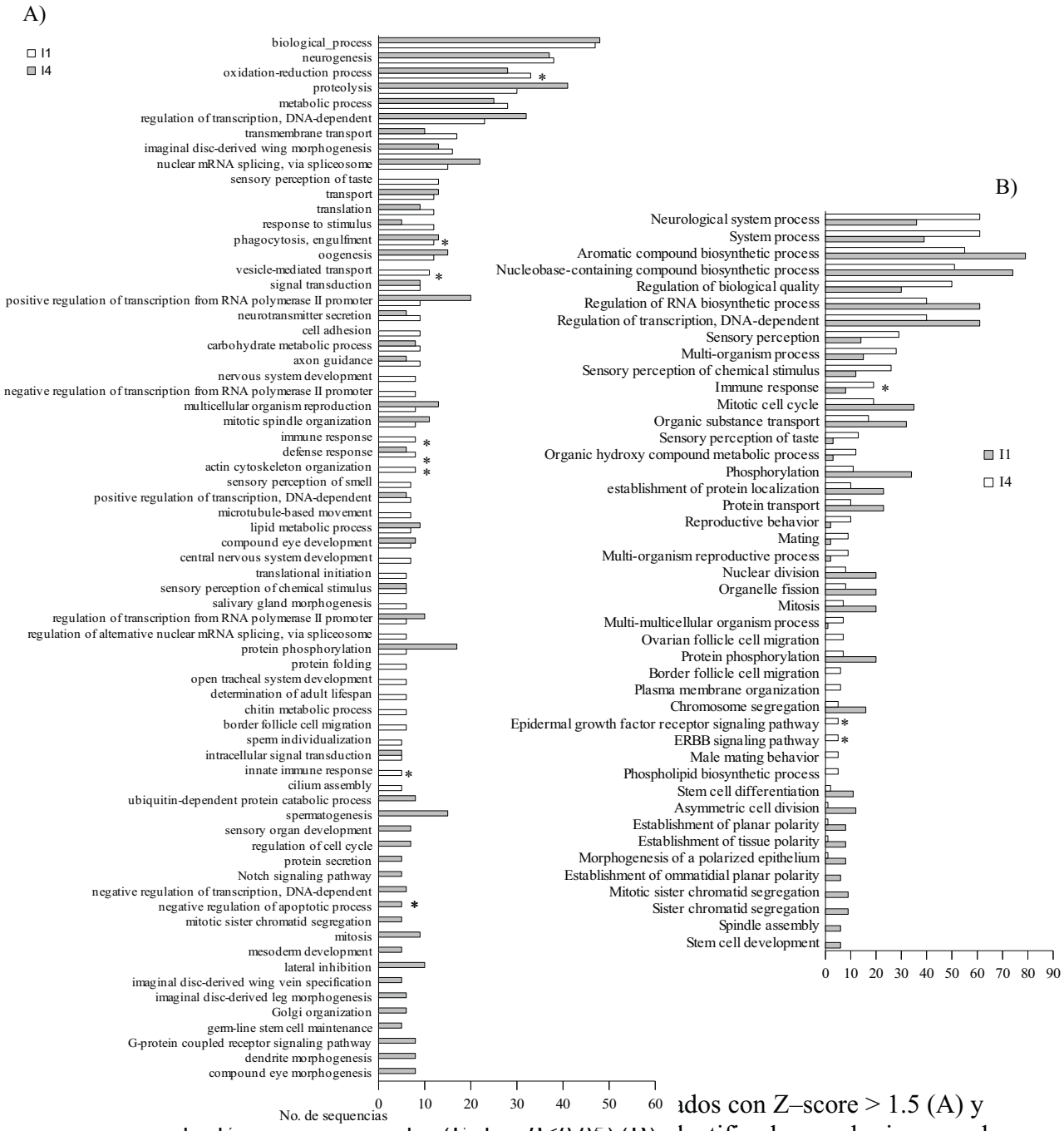
A partir de los tres microarreglos se identificaron entre 749 y 1141 genes diferencialmente expresados (Z–score > 1.5) entre condiciones (Tabla XIX).

Tabla XIX. Número de genes con expresión diferencial (Z–score > 1.5) identificados en tres microarreglos analizados con *C. corteziensis* con diferentes niveles de infección por *P. marinus* y bajo diferentes condiciones.

Arreglo	Origen de la condición de infección	Nivel de infección por *P. marinus*	No. de genes Z–score > 1.5
A	Nayarit	Uno	749
		Cuatro	755
B	BCS	Dos	865
		Tres	1141
C	Laboratorio	Tres	946
		Cinco	919

Los procesos biológicos de respuesta inmune con términos enriquecidos obtenidos mediante la prueba de Fisher (P >0.05) de ostiones de Nayarit fueron: *Immune response*, y e*pidermal growth factor receptor signalilng pathway* (Fig. 42), los ostiones de BCS presentaron los siguientes procesos enriquecidos: *synaptic transmision*, *microtubule cytosketelon organization* (Fig. 43), y los ostiones experimentales: *cellular response to stimulus*, *negative regulation of signaling and cell comunication*, y *autophagic cell death* (Fig. 44).

Dentro de cada proceso biológico se identificaron los genes que fueron sobre–expresados bajo las tres comparaciones de infección. En procesos como la apoptosis, se encontró que ocurre tanto en ostiones con infección 1 y 4, sin embargo, los genes en cada condición son diferentes (Tabla XX, XXI). En ostiones de BCS bajo ambas condiciones de infección se obtuvieron diferentes genes que participan en fagocitosis, apoptosis, respuesta de defensa y señalizadores toll (Tabla XXII, XXIII). En ostiones experimentales se obtuvieron genes relacionados a apoptosis en ambas condiciones de infección (Tabla XXIV, XXV) y en ostiones con infección 5 se obtuvo la sobre-expresión del gen SOD (Tabla XXV).



ıdos con Z–score > 1.5 (A) y procesos biológicos enriquecidos (Fisher $P<0.05$) (B) ıdentificados en el microarreglo hibridizado con *C. corteziensis* de Nayarit con infección uno (barras blancas) e infección cuatro (barras grises) por *P. marinus.*

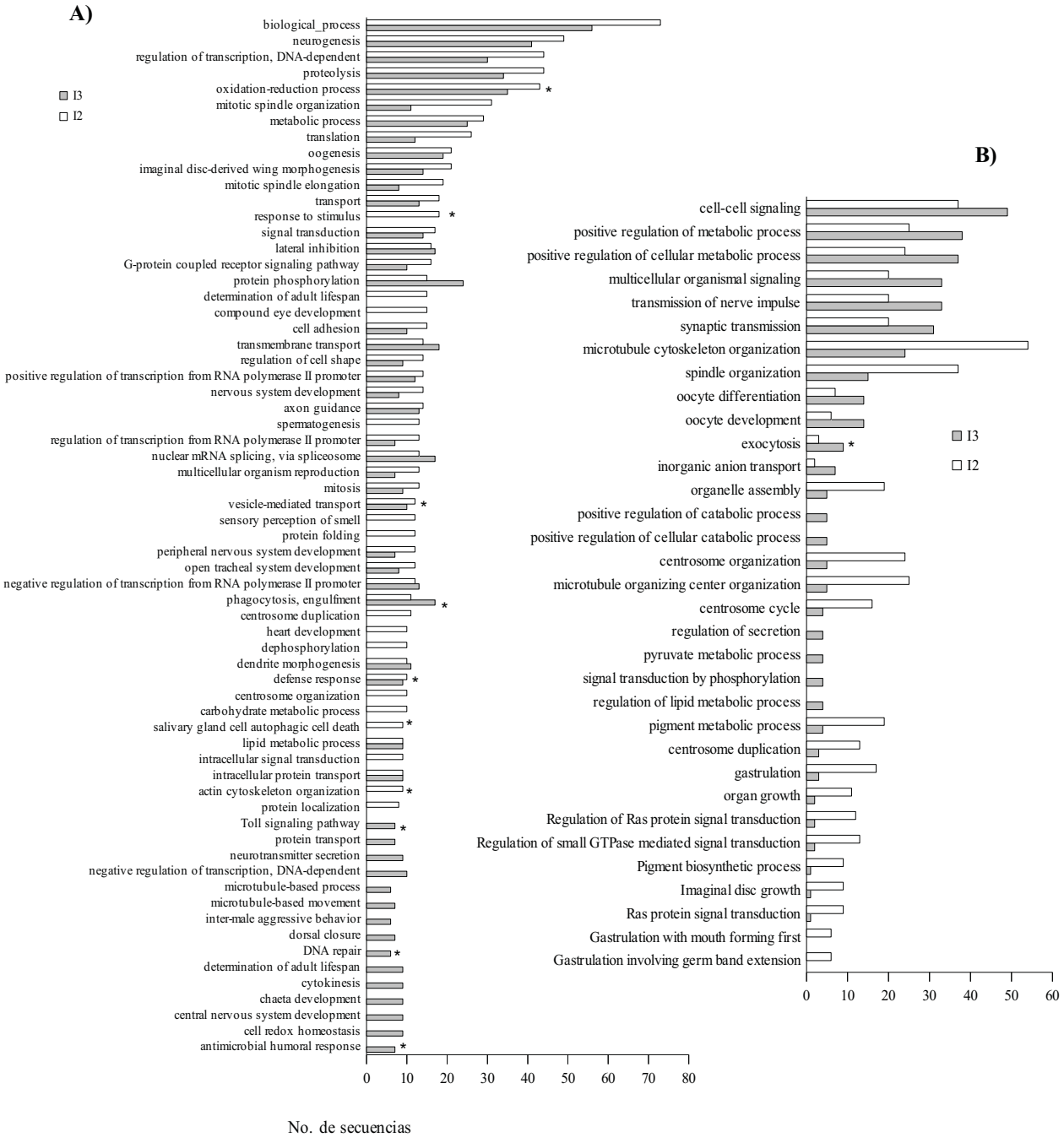


Fig. 43. Procesos biológicos de los genes sobreexpresados con Z–score > 1.5 (A) y procesos biológicos enriquecidos (Fisher $P<0.05$) (B) identificados en el microarreglo hibridizado con *C. corteziensis* de BCS con infección dos (barras blancas) e infección tres (barras grises) por *P. marinus.*

Fig. 44. Procesos biológicos de los genes sobreexpresados con Z–score > 1.5 (A) y procesos biológicos enriquecidos (Fisher $P<0.05$) (B) identificados en el microarreglo hibridizado con *C. corteziensis* experimentales con infección tres (barras blancas) e infección cinco (barras grises) por *P. marinus.*

7.16 Identificación de los procesos de respuesta inmune

En los mecanismos de respuesta inmune el mayor número de genes estuvo representado en los procesos de oxido–reducción tanto en organismos con alta infección como en ostiones con baja infección (Fig. 45).

Los genes involucrados en la fagocitosis se presentaron en los tres microarreglos bajo las dos condiciones de infección, siendo mayor el número de genes en ostiones con infecciones altas. Los procesos biológicos que se presentaron solo en organismos con infecciones altas fueron: regulación negativa de apoptosis, señalizadores toll, respuesta humoral antimicrobiana, reparación ADN (Fig. 45). Los procesos biológicos que únicamente se presentaron en ostiones con baja infección fueron: autofagia, respuesta a estímulos, response al daño al ADN, respuesta a estrés oxidativo, respuesta de defensa, organización del citoesquelto por actina.

Debido a que no se encontraron ostiones libres de *P. marinus* se realizaron comparaciones entre ostiones con infecciones bajas y altas, sin embargo, en ostiones hibridizados en el arreglo B la intensidad alta fue de tres, la cual es igual a la condición que se consideró como infección baja en el microarreglo C, por tal motivo se realizó el análisis interacción de genes que nos permitió obtener un panorama general de las interacciones de los genes con Z–score > 1.5 de genes con alta y baja infección. Se considera que el conjunto de genes relacionados a la fagocitosis, respuesta de defensa (Fig. 46), activación de la apoptosis, factor nuclear NF–κβ, oxido reducción y respuesta inmune (Fig. 47), intervienen en la defensa ante *P. marinus* tanto en infecciones altas como en bajas.

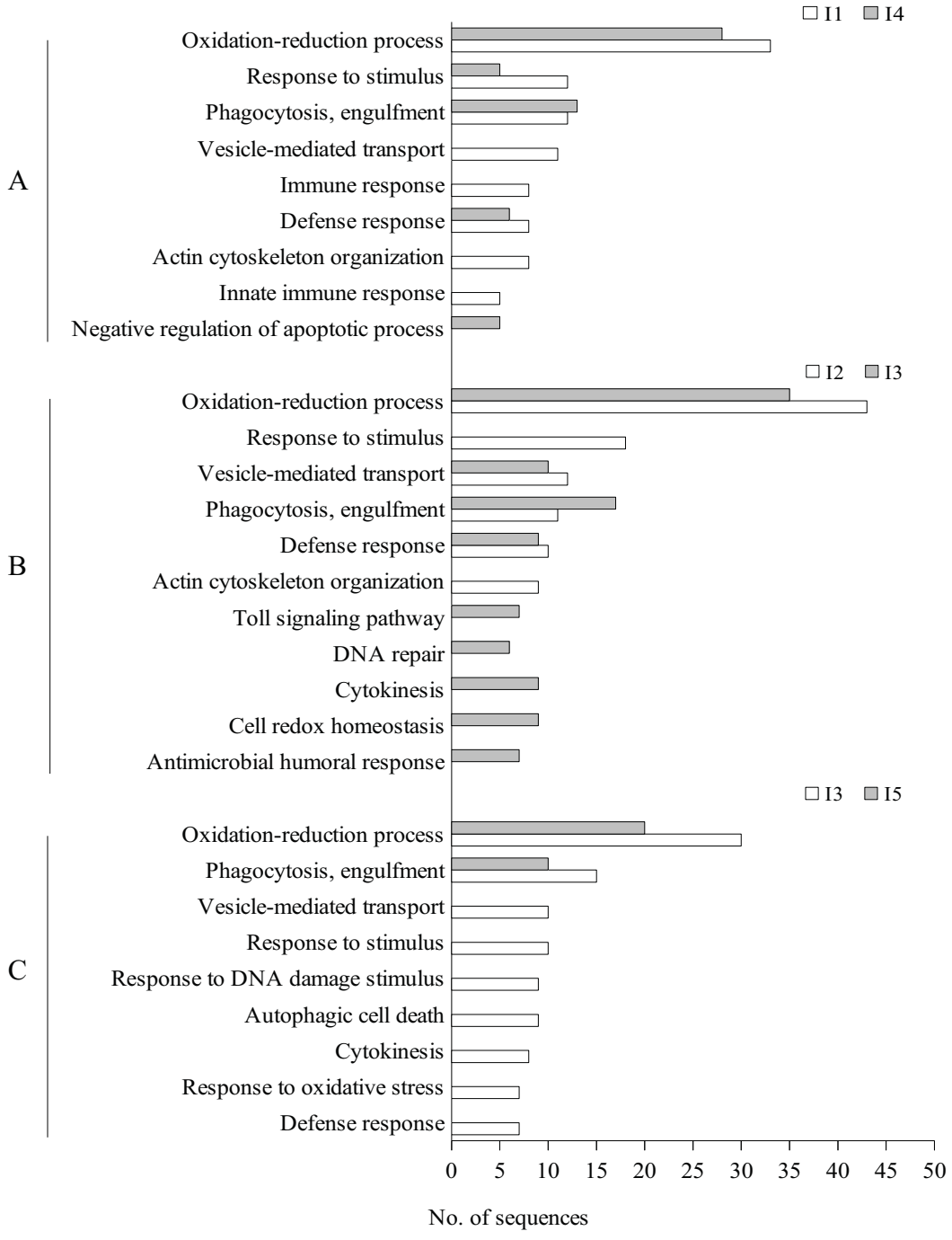


Fig. 45. Número de genes con Z–score > 1.5 por procesos de respuesta inmune de *C. corteziensis* de Nayarit (A), BCS (B), y ostiones experimentales (C) con infecciones bajas (barras blancas) y altas infecciones (barras grises) de *P. marinus*.

Tabla XX. Genes de respuesta inmune sobre–expresados en *C. corteziensis* de Nayarit con infección nivel uno.

Proceso	ID	Nombre del gen	Procesos biológicos	GO
Fagocitosis	CG10194		phagocytosis engulfment	2
	CG10539	RPS6-p70 protein kinase	synaptic ggrowth, actin filament organization	27
	CG3242	sister of odd and bowl	imaginal disc derived leg joint, phagocytosis, regulation of trascription	8
	CG7068	Thioester containing protein III	defense response to gram positive bacterium, phagocytosis	5
	CG57277	Intronic protein 259	phagocytosis engulfment, neurogenesis	2
	CG5198	hole in one	wound healing, compound eye	10
	CG4545	Serotonine trasnporter	neurotransmtter transpor, phagocytosis	14
	CG7365		lipid metabolic process, phagocytosis engulfment	4
	CG5844		metabolic process, phagocytosis engulfment, cellular response to hypoxia	5
	CG3992	serpent	cellular process, et etc	34
	CG5599		fatty acyl CoA, metabolic process, phagocytosis	9
	CG9779	Charged vesicular body protein	protein transport, phagocytosis engulfment	2
Respuesta inmune	CG15687	poor imd response konck in	negative regultation of innate immune response, negative regulation of peptidoglycan recognition protein signaling pathway	6
	CG14226	domeless	JAK-stat, immune response	21
	CG31770	Hemese	innate immune response, negative regulation, encapsulation of foreing target	3
	CG16910	Kenny	Toll signaling pathway, defense response to gram-negative bacterium, antimicrobial humoral response. Essential signaling component in transmitting the lipololysaccharide signal to cact degradation.	14
	CG32042	Peptidoglycan recognition	Innate immune response, defense response, peptidoglycan catabolic processs, detectioin bacterium	10
	CG6794	Dorsal related immunity factor	positive regulation antifungal peptide biosynthetic process, defense response to fungus. DIF binds to the kappa-B consensus sequence	25
	CG7528	Smt3 activating enzyme 2	humoral immune response, positive regulation of NF-Kappa transcription	14
	CG5212	Pellino	Toll signaling pathway, immune response, defense respons, signal trasduction	6
	CG8843	sec5	endocytic recycling, vesicle mediated transport	22
	CG8846	Thor	negative regulation of translation,, antibacterial humoral response, response stress, response to	13
	CG8856	Scavenger receptor class type II	immune response, defense response	6
	CG8896	18 wheeler	antibacterial humoral response, dell adhesion, multicellular organismal development	16
Respuesta de defensa	CG14027	Turandot M	Cellular response to heat, defense response to Gram-positive bacterium, response to stress	7
	CG14899	Derlin-2	Defense response to bacterium, endoplasmic reticulum unfolded protein response	5
	CG18106	Immune induced molecule 2	defense response, extracellular region	2
	CG16910			
	CG7068			
	CG6794			
	CG5489	Autophagy specific gene 7	Determination od adult lifespan, regulatioin of defense to virus, macroautophagy	9
	CG7594	Eig71Eh	Defense response to bacterium, metamorphosis	3
	CG7325	Eig71Ek	Defense response to bacterium, extracelular region	3
	CG3992			
	CG5212			
	CG8846	Thor	negative regulation of translational initiation, antibacterial humoral response, response to stress, response to starvation, negativer regulator of cell size	13
	CG8856			
	CG8896			
Apoptósis	CG14217	Tao	positive regulation of hippo signaling cascade, apoptotic process	16
	CG3231	something thath sticks like glue	apoptotic process, neurogenesis,	7
	CG5370	Death caspase-1	nurse cell apoptotic process, actin filament, autophagic cell, activador de cascada de caspasas responsables de apoptósis	19
	CG6779	Ribosomal protein S3	response to DNA damae stimulus, mitosis	19
	CG5014	Vap-33-1	synaptic vesicle priming, nurotransmitter secretion, nueron apoptotic process	8
	CG8493	Deneddylase 1	positive regulation of apoptotic process, protein deneddylation	5

Tabla XXI. Genes de respuesta inmune sobre–expresados en *C. corteziensis* de Nayarit con infección nivel cuatro.

Proceso	ID	Nombre del gen	Procesos biológicos	GO
Respuesta de defensa	CG10719	brain tumor	neurogenesis, axonguidance, negative regulation of cell cycle, phagocytosis	26
	CG10583	Separase	mitotic sister chromatid segregation, neurogenesis, phagocytosis, meiosis I	7
	CG10605	Caupolican	Positive regulation of transcription, phagocytosis engulfment, morphogenesis	13
	CG10198	Nucleoporin	Germ-line cell maintenance, phagocytosis engulfment	5
	CG14813	Delta-coatomer protein	Regulation of tube diameter, open tracheal system, vesicle mediated transport	11
	CG3057	Congested like trachea	carnitine transport, mitochondrial transport, phagocytosis	8
	CG2244	MTA1-like	phagocytosis, regulation of transcription DNA dependent	9
	CG22111		proteolysis, zinc-ion binding, phagocytosis	4
	CG4494	Smt3	mitotic spindle organization, phagocytosis	20
	CG6251	Nucleoporin62	phagocytosis engulfment, nuclear pore	3
	CG6501	nucleostemin2	phagocytosis, compound eye morphogenesis	7
	CG4845	Phagocyte signaling impaired	Humoral immune response, phagocytosis	7
	CG6364		metabolic process, phagocytosis, CTP salvage,	8
Respuesta inmune	CG10610	Ecsit	Toll signaling pathway, innate immune response, defense response, signaling transduction	6
	CG2078	Myd88	defense response to gram positive bacterium, toll signaling pathway, defense response, signal transduction, positive regulation antifungal peptide production	18
	CG32382	sphinx1	defense response to gram-positive bacterium, defense response to gram negative, regulation of toll signaling pathway, defense response to fungus	7
	CG18112	vacuolar protein sorting 16B	immune response, phagosome maduration	4
	CG9697	PGR-SB2	immune response, defense response, peptidoglycan catabolic process	8
Apoptosis	CG13263	cytochrome c distal	regulation of compound eye retinal cell programmed cell death, oxidative hosphorylation, apoptotic process	12
	CG14637	abstrakt	establishment of cell polarity, apoptotic process, nuclear mRNA splicing, anatomical structural morphogenesis	14
	CG12265	Deterin	cytokinesis, actomyosin contractile ring assembly, negative regulation of apoptotic process, cytokinensis	11
	CG1548	cathD	nurse cell apoptotic process, authophagic cell death, apoptotic process	8
	CG18188	Death associated MCH2	induction of apoptosis, programmed cell death	5
	CG6437	GlcT-1	Negative regulation of apoptotic process	5
	CG6151	flower	synaptic vesicle endocytosis, regulation of apoptotic process	6
	CG6303	Bruce	Negative regultation of apoptotic process, sperm indivualization	8
	CG5637	nanos	negative regulation of apoptotic process, negative regulation of gene expression	25
	CG7413	Retinoblastoma-family protein	negative regulation of apoptotic proces, mitotic cell cycle	25
	CG40410	Apoptosis-linked gene2	positive regulation of JNK cascade, apoptotic process	4

Tabla XXII. Genes de respuesta inmune sobre–expresados en *C. corteziensis* de BCS con infección nivel dos.

Proceso	ID	Nombre del gen	Procesos biológicos
Respuesta de defensa	CG12789	scavenger receptor acting in neural tissue	phototransduction, thermotaxis, defense response
	CG12763	Diptericin	defense response to gram-negative bacterium, antibacterial humoral response, innate immune response, defense response to bacterium
	CG1102	Melanization protease 1	defense response, melanization defense response
	CG13788	Gustatory receptor 28b	defense response to bacterium, melanization defense response
	CG13788	Spatzle processing enzyme	defense response to gram-positive bacterium, toll signalling pathway, humoral response immune
	CG2914	Ets at 21C	defense response to bacterium, dendrite morphogenesis
	CG32282	Drosomycin-4	defense response, defense response to fungus
	CG32464	Mustard	defense response to gram-negative bacterium, activatr of innamet immune response
	CG4280	croquemort	apopototic process, immune response regulating cell, regulation of phagocytosis. Receptor macrofago de delulas apoptoticas
	CG5212	Pellino	Toll signaling pathway, immune response, signal trasduction
	CG5475	MPk2	MAPK cascade, response to oxidative stress
	CG8293	Inhibitor of apoptosis 2	defense to gram-negative, regulation negative of apoptotic process, peptidoglycan recognition protein signaling pathway
Fagocitosis	CG12306	polo	male miosis, mitosis
	CG3242	Sister of odd and bowl	imaginal disc derived joint morphogenesis
	CG17800	Down syndrome cell adhesion	dendrite self-avoidance, phagocytosis
	CG4845	Phagocyte signaling imapaired (psdin)	humoral immune response, immune response, phagocytosis engulfment
	CG4136	visual system homebox 1	negative regulation of transcription from RNA polymerase, phagocytosis
	CG6831	Rhea	negative regulation of transcription from RNA polymerase, phagocytosis
	CG7923	Fad2	court ship behavior, cytokinesis, phagocytosis engulfment, oxidation reduction process
	CG7275		phagocytosis, neurogenesis
	CG7847	stripe	central nerviosus system development
	CG9737		Phagocytosis, engulfment, serine type endopeptidase activity
Señalizadores Toll	CG14928	Spatzle 4	toll signalling pathway
	CG16705	Spatzle processing enzyme	Defense response to gram-positive bacterium, toll signalling pathway, humoral response immune
Procesos de oxido-reducción	CG12002	Peroxidasin	Response to oxidative stress
Apoptósis	CG30116		apoptotic protease activator activity
	CG4280	Croquemont	
	CG4005	yorkie	positive regulation of transcription from RNA polymerase, negative regulation of apoptotic process
	CG32491	modifier of mdg4	induction apoptosis, oogenesis, regulation of apoptotic process, nucleus organizatoin, male meiosis
	CG7863	Dream	apoptotic process, programmed cell death, salivary gland histolysis
	CG8293	Inhibitor of apoptosis 2	
	CG7188	Bax inhibitor 1	negative regulation apoptotic process, autophagic cell death, negative regulation of autophagy
	CG7850	Puckered	negative regulation of apoptotic process, response to oxidative stress, actin filament

Tabla XXIII. Genes de respuesta inmune sobre–expresados en *C. corteziensis* de BCS con infección nivel tres.

Proceso	ID	Nombre del gen	Procesos biológicos
Fagocitosis	CG12071		Phagocytosis engulfment
	CG16791		Phagocytosis engulfment
	CG17754		Phagocytosis engulfment
	CG2028	Casein kinase alpha	cell morphogenesis, phagocytosis engulfment
	CG5848	Cactus	Toll signaling pathway, innate immune response, antimicrobial humotal response, response to fungus
	CG6302	Lethal	Oogenesis, de novo proein folding, phagocytosis
	CG6359	Sortung nexin 3	phagocytosis, engulfment, regulation of canonical wnt receptor signaling
	CG6364		metabolism process, phagocytosis engulfment
	CG6124	eater	latheral inhibiton, phagocytosis recognition
	CG5884	Par-6	synapse assembly, cell adhesion, phagocytosis
	CG9881	p16-ARC	regulation of actin filament, phagocytosis
	CG6518	inactivation no afterpotential C	phototransduction, phagocytosis
	CG6501	Nucleostemin 2	phagocytosis engulfment, compound eye morphogenesis
	CG7961	Alpha-coatomer protein	cell morphogenesis, vesicle mediated transport, phagocytosis
	CG6479		phagocytosis engulfment
	CG6742	centaurin beta	cell morphogenesis, phagocytosis engulfment
	CG7610	ATP synthase-gamm	phagocytosis engulfment, ATP synthesis coupled proton transport
	CG6500	Beadex	Locomotor rhytm, phagocytosis
Respuesta de defensa	CG11331	Serpin 27A	Toll signaling pathway, negative regulation proteolysis, melanotic encapsulation of foreing target, defense response to fungus, serine type endopeptidase inhibitor activity
	CG12245	glial cells missing	Positive regulation of transcription from RNA, hemopoiesis, defense response
	CG10794	Diptericin B	Defense response to gram positive bacterium, antibacterial humoral response
	CG1361	Andropin	Defense response to gram-positive bacterium, multicellular resproductioni
	CG18241	Toll-4	Innate immune response, cytokinesis, defense response, receptor transmembranal
	CG2397	Cyp6a13	defense response to bacterium, osidation reduction process
	CG15066	Immune induced molecute 23	defense response to gram positive bacterium, toll signaling pathway, antibacterial humoral response
	CG16799		Defense response, antimicrobial humoral response
	CG16910	kenny	Toll signaling pathway, defense response to gram-negative bacterium, immune response, antimicrobial humoral response
	CG20801	Vago	defense response to virus
	CG2247		defense response to bacterium, osidation reduction process
	CG5848	Cactus	Toll signaling pathway, innate immune response, oogenesis, antifungal humoral response, degradado por ird5
	CG4437	peptidoglycan recognition	Innate immune response, peptidoglycan recognition signaling pathway, negative regulation of JNK cascade
	CG4920	easter	Toll signaling pathway, proteolysis, zymogen activation, serine type endopeptidase
	CG4201	immune response deficient 5	Toll signaling pathway, antibacterial immune response, I-kappaB phosphorylation, regulation od immune response, defense response to virus, Immune response deficient. Required for the activation of the NF-kappa-B factor relish (Rel) essential signaling component in transmitting the lipopolysaccharide signal to cact degradation
	CG4353	hemipterous	positive regulation of JNK cascade, MAP-kinase, receptor signaling protein serine
	CG6186	Transferrin 1	defense response, cellualar iron homeostasis
	CG7355	Ecdysone-induced	defense response to bacterium, osidation reduction process
	CG9697	PGR-SB2	immune response, defense response, peptydoglycan catabolic process
Señalizadores Toll	CG11331		
	CG15066		
	CG16910		
	CG5848		
	CG4920		
	CG4201		
	CG9614	Pipe	Toll signaling pathway, maternal specification of dorsal ventral axis, oogenesis
Apoptósis	CG10059	MAGE	regulation of cell proliferation, negative regulation of neuron apoptotic process
	CG14722		apoptotic protease activator activity
	CG6151	flower	synaptic vesicle endocytosis, regulation of apoptotic process
	CG6303	Bruce	negative regulation of apoptotic process, spermatid development, programmed cell death
	CG32491	modifier of mdg4	male meiosis, induction of apoptosis, oogenesis, componente de la cromatina
	CG8409	Supressor of variegation 205	regulation of apoptotic process, negatice regulation of transcription, chromosome organization
	CG6437	GlcT-1	negative regulation apoptotic process, endoplasmic reticulum
	CG7788	Ice	regulation of retinal cell programmed cell death, apoptotic process, activador de las caspasas responsables de apoptósis

Tabla XXIV. Genes de respuesta inmune sobre–expresados en *C. corteziensis* experimentales con infección nivel tres (C3).

Proceso	ID	Nombre del gen	Procesos biológicos
Respuesta inmune	CG12489	defense repressor1	immune response, imaginal desc-deriverd wing morphogenesis, negative regulation of biosynthetic process of antibacterial peptides
Fagocitosis	CG13284		Phagocytosis engulfment, negative regulator of cell
	CG11652		Phagocytosis engulfment,peptidyl-diphthamide biosynthetic process
	CG10605	Caupolican	Phagocytosis engulfment
	CG10742	Tetraspanin 3A	Phagocytosis engulfment, negative regulator of cell
	CG7392	Connector of kinase to AP-1	Positive regulator of JNK cascade, phagocytosis engulfment
	CG7586	macroglobulin	Phagocytosis engulfment, response to yeast
	CG5790		Phagocytosis engulfment
	CG7923	Fad2	Phagocytosis engulfment, fatty acid biosynthetic process
	CG8522	Helix loop helix protein 106	Cell morphogenesis, phagocytosis engulfment, fatty acid
	CG7365		lipid metabolic process, phagocytosis engulfment
	CG5599		Phagocytosis engulfment, fatty acyl CoA
	CG6223	Beta-coatomer	Phagocytosis engulfment, regulation of lipid storade, vesicle mediated transport
	CG9677	Int6 homologue	Translation innitiation, phagocytosis engulfment
	CG9737		Phagocytosis engulfment, proteolysis
Respuesta de defensa	CG12789	Scavenger receptor acting	autophagic cell death, defense response, thermotaxis, rhodopsin
	CG14746	PGRP-SCla	innate immune response, defense response, peptidoglycan catabolic process
	CG14899	Derlin-2	defense response to bacterial, ER-associated protein catabolism
	CG3131	Dual oxidase	Regulation negative of apoptotic process, defense response to bacterium
	CG5140	No poles	Chromosome organization, defense response
	CG5212	Pellino	Toll signaling pathway, immune response, defense response, signal transduction
	CG7393	p38b	MAPK cascade, response stress, response to fungus
	CG8415	Rho1	
	CG7355	Ecdysone-induced gene 71Eb	Defense response to bacterium
	CG6680	Serpin 77Ba	Negative regulation of melanization defense response
	CG5490	Toll	Regulation of melanization defense, defense response to gram negative bacterium
	CG5993	Outstreched	
Apoptósis	CG1274	Thioredoxin peroxidase 2	Response to DNA stimulus, hydrogen peroxide, induction apoptosis
	CG1975	DNA fragmentation factor-related protein 2	Apoptotic process, neurogenesis
	CG30116		Apoptotic protease activator
	CG5371	Ribonucleoside diphosphate reductase large subuit	activation of cystein type endopeptidase activity involved apoptotic process
	CG8705	Peanut	Positive regulator of apoptotic process
	CG5383	Phosphatidylserine	Negative regulator of apoptotic process, negative regulator JNK cascade
	CG3131	Dual oxidase	
	CG4654	DP transcription	nurse cell apoptotic process, oogenesis

Tabla XXV. Genes de respuesta inmune sobre–expresados en *C. corteziensis* experimentales con infección nivel cinco (I5).

Proceso	ID	Nombre del gen	Procesos biológicos
Fagocitosis	CG12750		Phagocytosis, engulment, RNA metabolic process
	CG10539	RPS6-p70 protein kinase	synaptic growth at neuromuscular junction, phagocytosis
	CG12071		Phagocytosis, engulfment
	CG13281	CAS/CSE1 segregation protein	protein import into nucleus, apoptotic process
	CG30427		phagocytosis, pxidation reduction process
	CG31345		phagocytosis, engulment, detection of calcium ion
	CG2111		phagocytosis, engulfment
	CG25861		phagocytosis, engulfment
	CG6501	Nucleostemin 2	phagocytosis, engulfment, compound eye
	CG6302	Lethal	oogenesis, de novo protein, phagocytosis
	CG6091		phagocytosis, engulfment
	CG6479		phagocytosis, engulfment
	CG6359	Sortin nexin 3	intracellular protein transport, wing disc development
	CG4615		Phagocytosis, engulfment, neurogenesis, cytosysis
	CG6223		Cell morphogenesis, phagocytosis engulfment
	CG6500	Beadex	locomotor rhythm, phagocytosis engulfment
Oxido-reducción	CG11793	Superoxide dismutase	response to oxidative stress, determination of adult lifespan, removal of superoxide radicals
Apoptósis	CG11804	Ced-6	neuron remodeling, apoptotic cell clearance
	CG13263	cytocrome c	oxidative phosphorylation, sperm individualization
	CG13281	CAS/CSE1 segregation protein	
	CG3584	quaking related 58E-3	apoptotic process, regulation of alternative nuclear mRNA splicing
	CG32491	modifier of mdg4	male meiosis chromosome, induction apoptosis, oogenesis
	CG5671	Pten	
	CG7863	dream	apoptotic process, salicary gland histolysis, programmed cell death
	CG6303	Bruce	negative regulation of apoptotic process, spermatid development, programmed cell death
	CG7717	Mekk1	cellular response to heat, positive regulation JNK cascade, response to oxidative stress

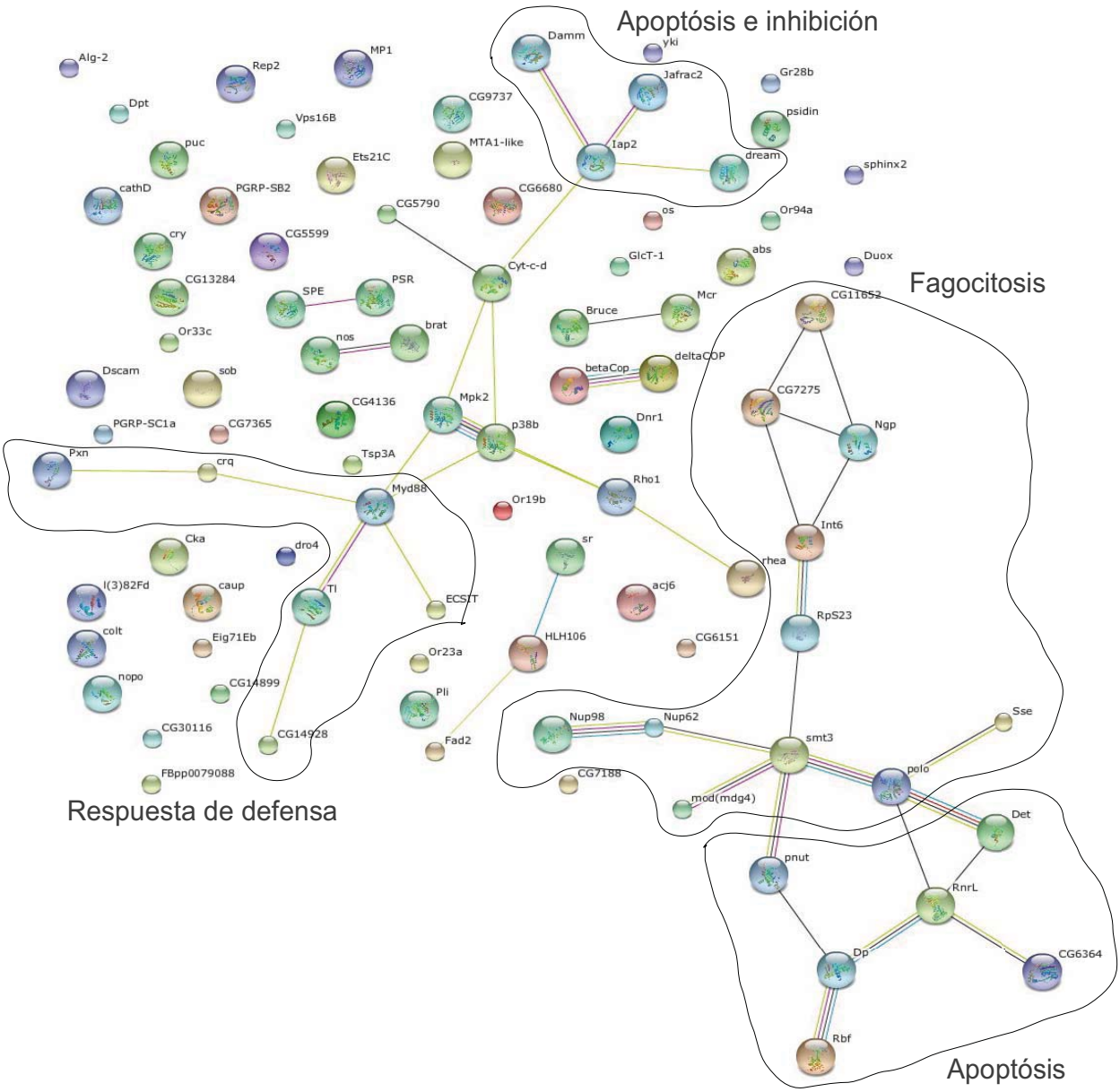


Fig. 46. Interactoma de genes sobre–expresados en ostiones con infecciones altas. Ostiones de Nayarit con infección cuatro, de BCS con infección tres y experimentales con infección cinco.

A nivel global se obtuvo que las interacciones de genes de ostiones con infecciones altas por *P. marinus* estuvieron relacionados con apoptosis, fagocitosis y respuesta de defensa (Fig. 46). En ostiones con baja infección (control) la interacción de genes se relacionó con

los mecanismos de respuesta inmune como el factor NF–κβ y los procesos de estrés oxidativo (Fig. 47), así como algunos genes de apoptosis.

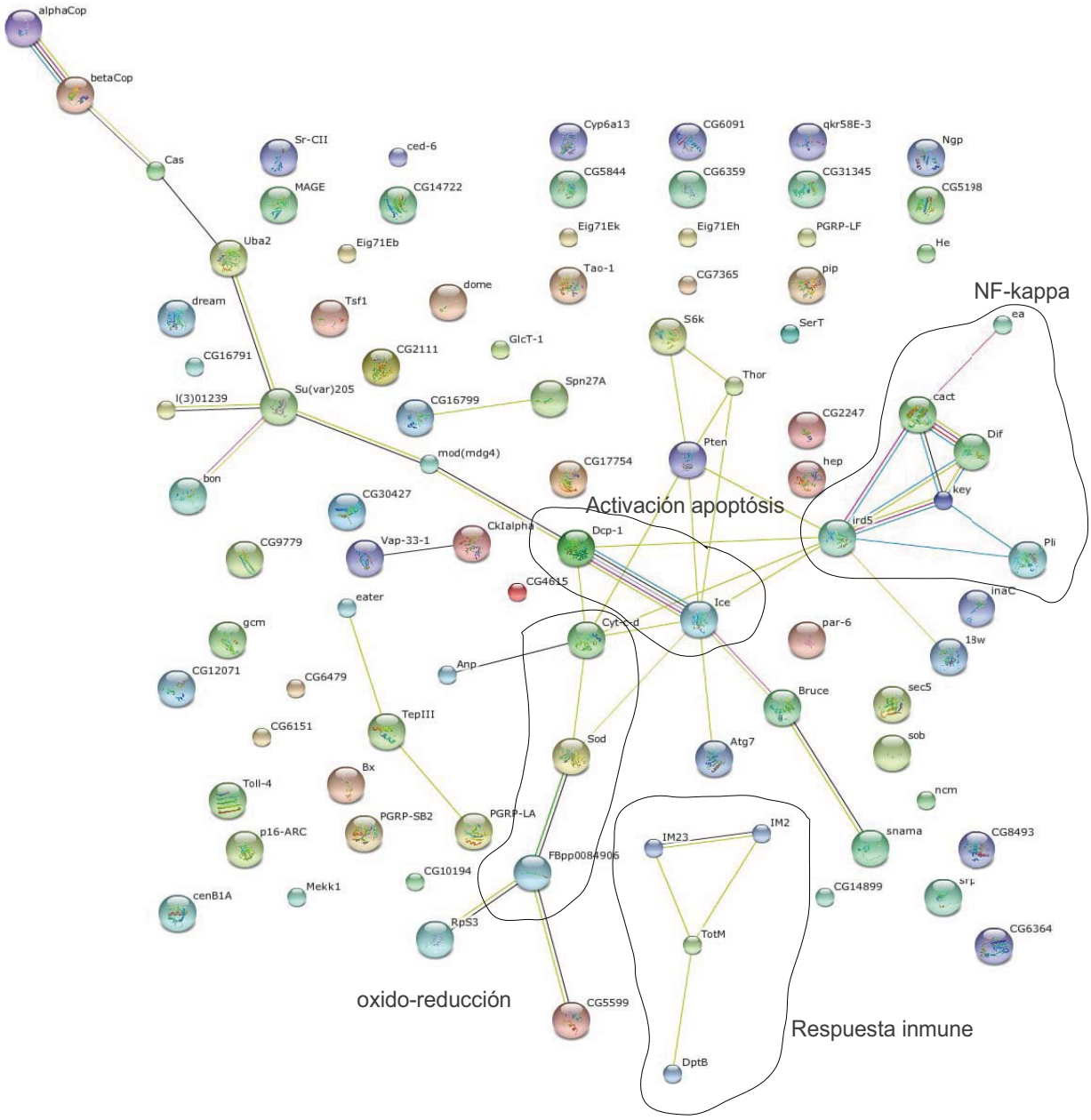


Fig. 47. Interactoma de genes sobre–expresados en ostiones con infecciones bajas. Ostiones de Nayarit con infección uno, de BCS con infección dos, y experimentales con infección tres.

De acuerdo a los interactomas, se eligieron genes involucrados en los tres procesos de respuesta inmune: traslocación del factor nuclear NF–κβ, fagocitosis y apoptosis. En las siguientes tres figuras se muestran los genes de *C. cortezienisis* que fueron analizados por qPCR (Fig. 48, 49 y 50). Otros genes como tubulinas, *Myd88*, genes relacionados con fagocitosis, genes de autofagia, y receptores toll, fueron considerados para ser evaluados, sin embargo, los iniciadores de estos genes en ciertos casos no amplificaron o no presentaron eficiencias adecuadas, por lo tanto fueron descartaron.

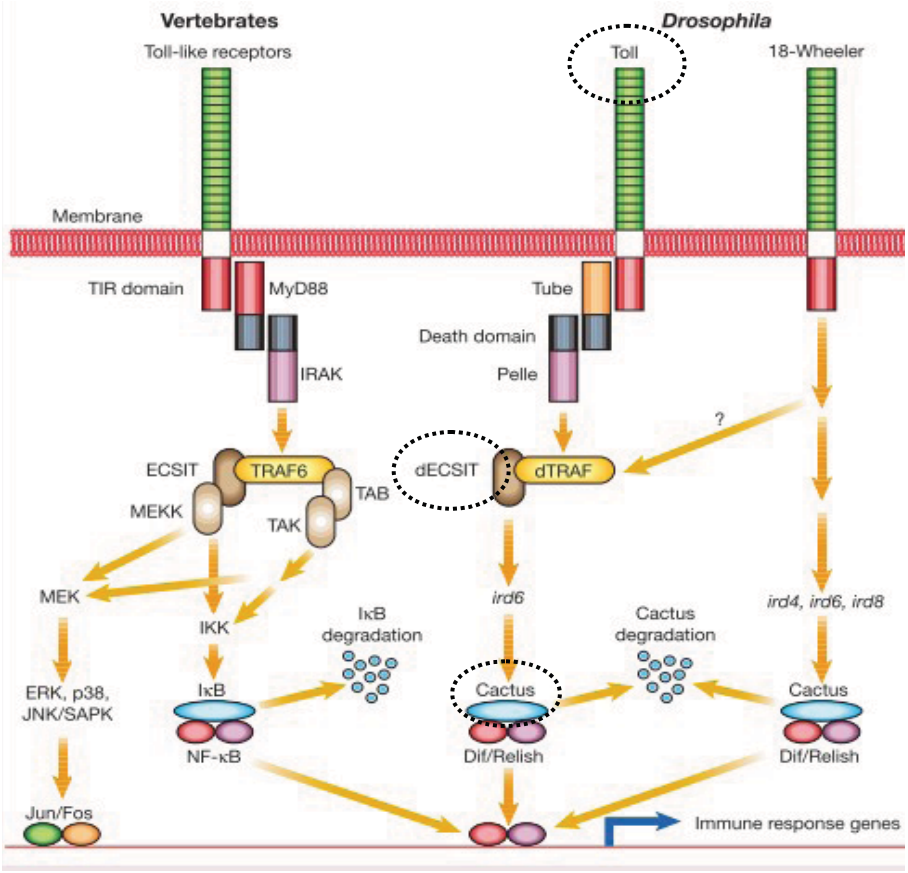


Fig. 48. Interacción de genes que participan en la traslocación del factor nuclear NF–κβ. Genes de *C.* corteziensis que fueron cuantificados por qPCR (círculos con línea punteada).

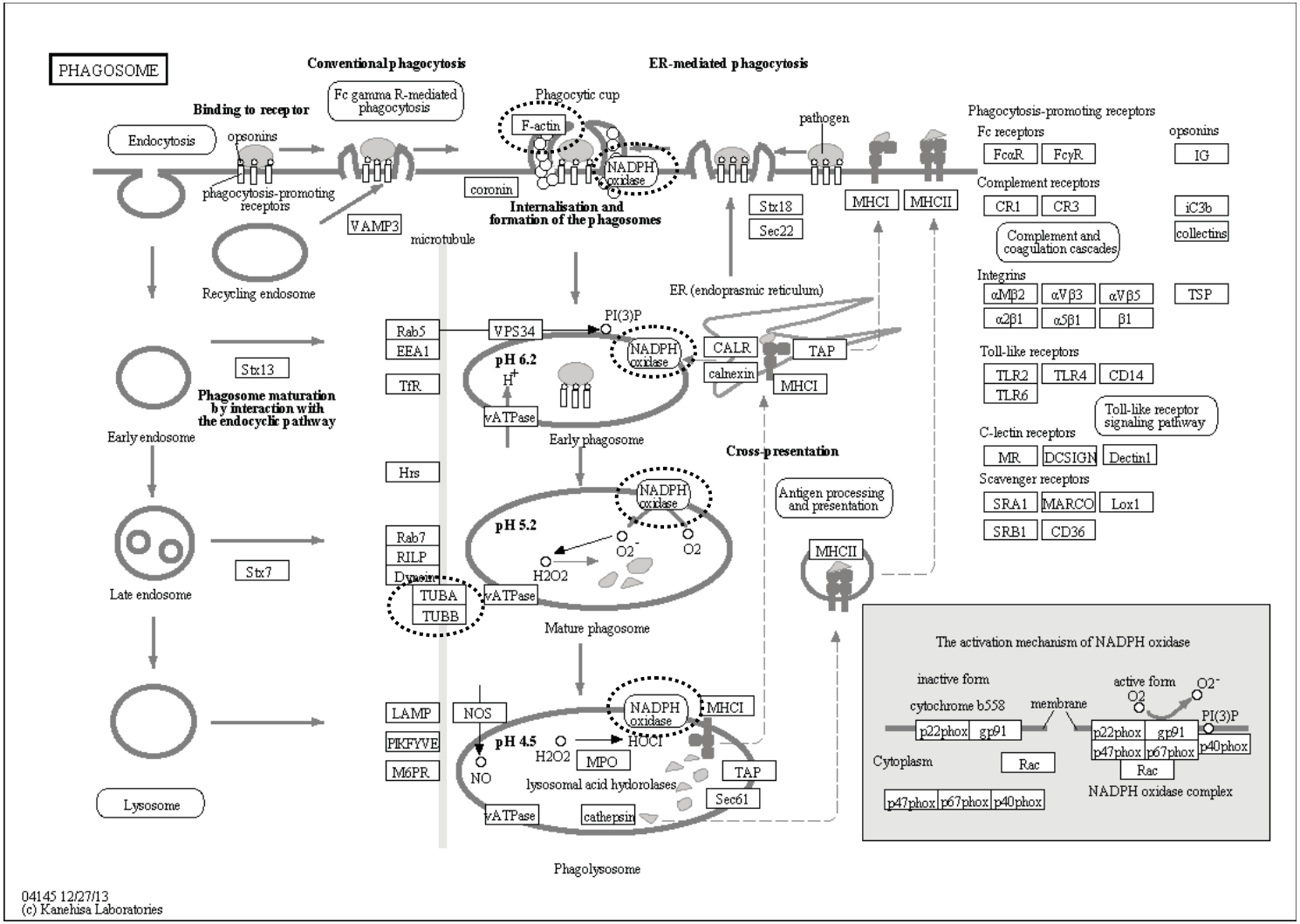


Fig. 49. Interacción de genes que participan en el fagosoma. Genes de *C. corteziensis* que fueron cuantificados por qPCR (círculos con línea punteada).

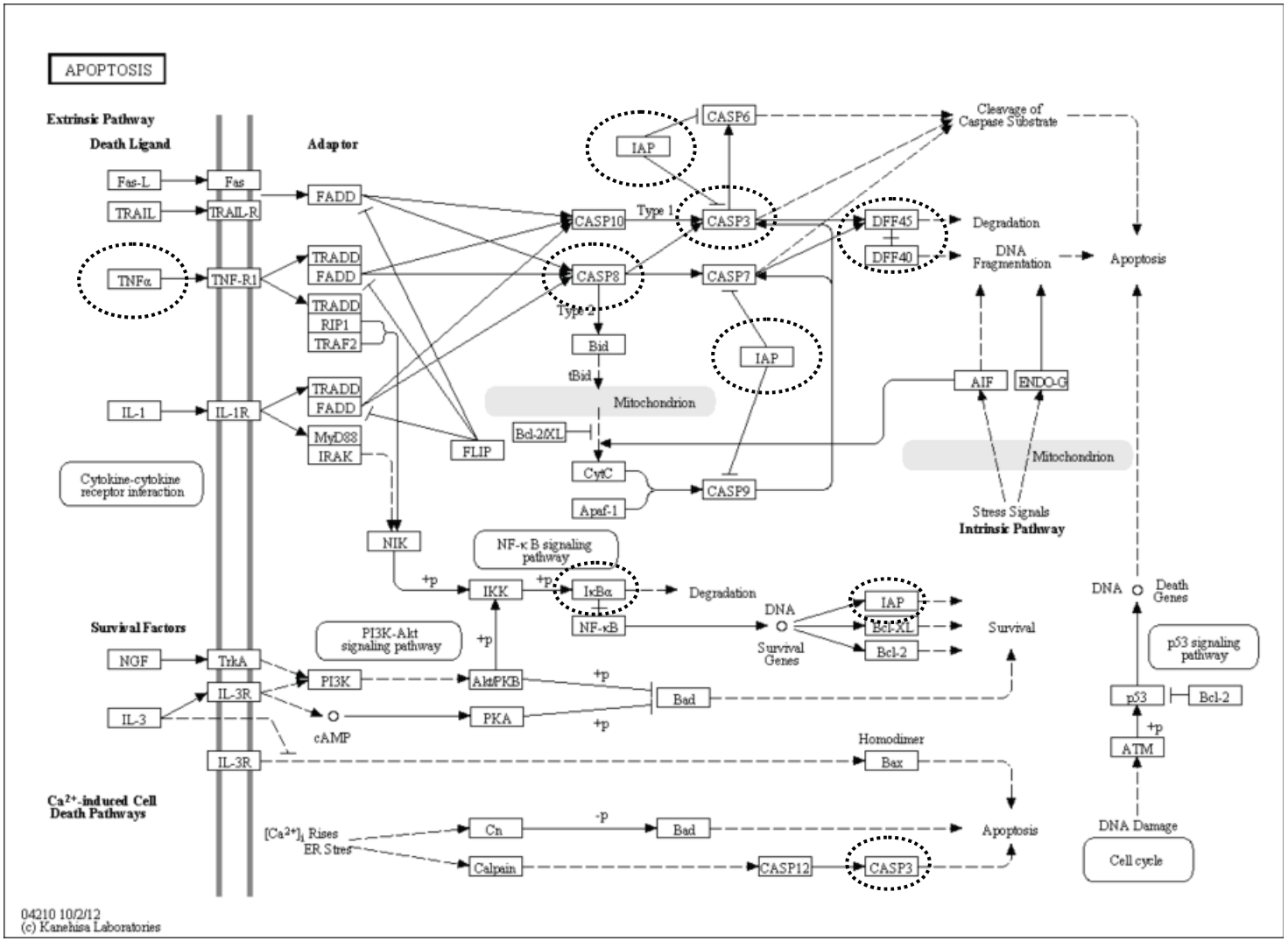


Fig. 50. Interacción de genes que participan en la apoptosis. Genes de *C. corteziensis* que fueron cuantificados por qPCR (círculos con línea punteada).

7.16.1 Niveles de expresión de genes de respuesta inmune

Las eficiencias de las curvas estándares de los transcritos de respuesta inmune realizadas por qPCR estuvieron entre el 90 y 100%. Se consideró que las condiciones para los genes a evaluar presentaron buenas eficiencias, de acuerdo a los estándares para la cuantificación relativa de transcritos por qPCR las curvas estándares deben cumplir con eficiencias ente el 90 y 110% (Tabla XXVI). Los nombres de los genes a evaluar, así como las abreviaturas que se utilizaron para referenciarlos en este trabajo se describen en la tabla XXVI.

El transcrito del inhibidor de serine proteasas (ISP) *CVS* que interviene en la resistencia de *C. virginica* ante *P. marinus*, fue identificado en branquias de *C. corteziensis.* La secuencia obtenida fue de 1,566 pb y presentó similitud de 1e-134 con el ISP de *C. gigas.* Los análisis de expresión relativa mostraron que los niveles del transcrito ISP de *C. corteziensis* fueron significativamente diferentes entre el grupo C3 con la infección más baja respecto a los organismos con la infección más alta (I5), siendo menores en el grupo I5 respecto al grupo C3. Los ostiones con infecciones tres y cuatro de los grupos C3, C4 e I4, no presentaron diferencias significativas del transcrito ISP (Fig. 51).

Tabla XXVI. BlastX hits de los genes de *C. corteziensis* y eficiencias de las curvas estándares de qPCR.

Proceso biológico	No. acceso de *D melaogaster*	Función en *D. melaogaster*	Arreglo en donde fue identificado y condición*	No. de acceso para *C. corteziensis*	Función en *C. corteziensis*	Longitud (pb)	Similitud con la especie	Score	e–value	Identidad	Tm °C	Tamaño del fragmento (pb)	qPCR E (%)
Genes de referencia	cg7283	Ribosomal protein L10	A, B, C (LI and HI)	Contig_1162	Ribosomal protein L10 (RPL10)	726	*Drosophila sechellia* (NP_648514)	404	4.00E-095	100%	63.6 63.4	117	92
	cg12055	Glyceraldehyde–3–phosphate dehydrogenase 1		Contig_4	Glyceraldehyde–3–phosphate dehydrogenase 1 (GAPDH)	1602	*Drosophila melanogaster* (NP_525108)	621	0	100%	64.7 63.4	84	100
	cg1263	Ribosomal protein L8		Contig_1120	Ribosomal protein L8 (RPL8)	940	*Ostrea edulis* (AFA34382)	488	5.00E-169	97%	63.8 63.9	160	93.64
	cg10067	Beta–actin		Contig_856	Beta-actin (ACT–β)	383	*Crassostrea ariakensis* (ABE99841)	269	1.00E-088	100%	63.9 63.9	145	92.6
Respuesta inmune	cg9737	Without annotation	B (HI), C (HI)	Contig_4959	Inhibidor of serine proteases (ISP)	1566	*Crassostrea gigas* (EKC37817)	598	1.00E-134	70%	63.2 63.8	95	93.1
Oxido–reducción	cg3131	Dual oxidase	C (HI)	Contig_399	Dual oxidase 2 (DUOX)	5920	*Crassostrea gigas* (EKC39815)	2475	0	89%	63.6 63.6	104	96.7
	cg12002	Peroxidasin (Pxn)	B (HI)	Contig_15279	Peroxidasin (PEROX)	706	*Tursiops truncatus* (XP_004311896)	197	1.00E-007	37%	62.2 63.7	81	94.2
	cg11512	Glutathione S transferase	B (LI), C (LI)	Contig_4190	Glutathione S transferase (GST)	1944	*Crassostrea gigas* (EKC36795)	346	1.00E-111	76%	65.1 63.4	148	90
	cg11793	Superoxide dismutase	C (LI)	Contig_1230	Superoxide dismutase Cu-Zn (SOD)	761	*Crassostrea gigas* (EKC39001)	296	6.00E-098	85%	63.7 64.6	146	91.8
NF-Kappa	---	---	No identified	Contig_160	Lipopolysacharide induced TNF alpha factor (LPTNF)	885	*Crassostrea gigas* (EKC36232)	143	6.00E-039	87%	64.8 63.2	102	91.1
	cg10610	Evolutionarily conserved intermediate in toll pathway	A (HI)	Contig 57858	Evolutionarily conserved intermediate in toll pathway (ECSIT)	901	*Crassostrea gigas* (EKC26622)	329	7.00E-107	77%	63.84 64.36	101	99.2
	cg5848	NF–kappa–B inhibitor epsilon (cactus)	B (LI)	Contig_2430	NF-kappa-B inhibitor epsilon (NF–K–INH)	1698	*Crassostrea gigas* (EKC37831)	516	2.00E-177	76%	63.43 64.06	229	97.7
Apoptosis	cg5370	Death caspase–1	A (LI)	Contig_9921	Caspase 8 (CAS8)	3681	*Crassostrea gigas* (EKC27835)	665	0	70%	64.6 63.2	164	90.1
	cg7788	Ice	B (LI)	Contig_35121	Caspase 3 (CAS3)	809	*Crassostrea gigas* (EKC30354)	540	0	96%	62.86 63.52	101	92.2
	cg12265	Deterin	A (HI)	26966 (p)	Deterin apoptosis (B–IAP)	414	*Crassostrea gigas* (EKC24792)	140	3.00E-040	86%	64.22 65.72	150	98.6
	cg8293	Inhibitor apoptosis 2	B (HI)	Contig_1125	Baculoviral Inhibitor apoptosis 2 (B–IAP2)	743	*Crassostrea gigas* (EKC27835)	191	7.00E-055	59%	64.3 64.3	180	91.5
	cg1975	DNA fragmentation factor–related protein 2	C (HI)	Contig_6480	DNA fragmentation factor subnit alpha (DNA–FRAG)	1318	*Crassostrea gigas* (EKC41810)	342	6.00E-113	65%	61.47 61.48	177	97.5

*Baja infección (LI) y alta infección (HI) de ostiones hibridizados en los arreglos A, B y C.

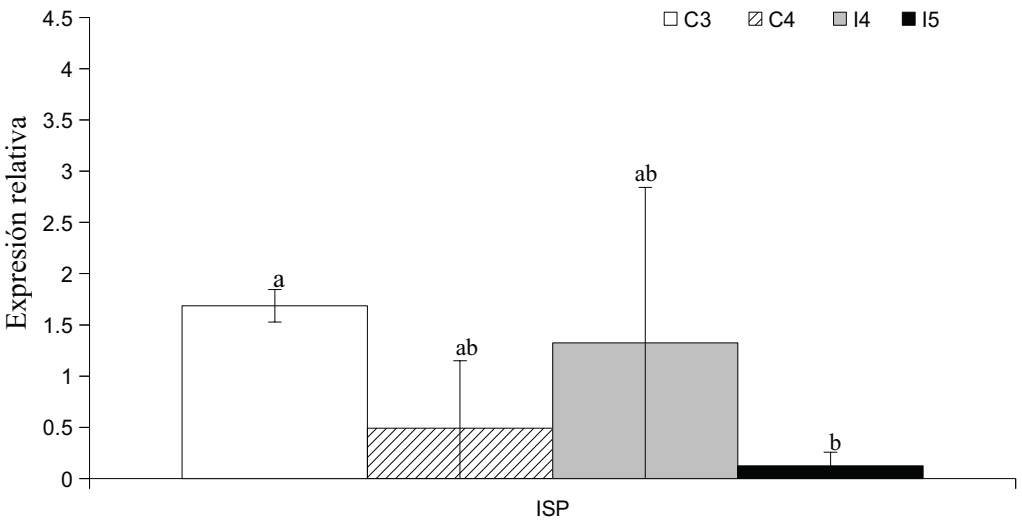


Fig. 51. Expresión relativa del inhibidor de serine proteasas (ISP) normalizada con la media geométrica de RPL10, GAPDH y RPL8 de ostiones controles (C) con intensidades de *P. marinus* de tres (C3) y cuatro (C4) y de ostiones inyectados con *P. marinus* (I) que presentaron intensidades cuatro (I4) y cinco (I5). Las diferencias significativas se indican con diferentes letras sobre las barras de la media y la desviación estándar.

Los genes DUOX o NADPH, PEROX, GST, SOD y ACT–β fueron agrupados en la gráfica (Fig. 52) debido a su potencial participación en la fagocitosis. El transcrito NADPH que participa en la producción de radicales libres presentó diferencias significativas entre los niveles de expresión entre los grupos C4 e I5 respecto a los ostiones C3.

Los transcritos para de las enzimas antioxidantes, prestaron disminución del gen GST en los organismos con alta infección (I5). En todas las categorías de infección se presentó una alta variabilidad intraespecífica que es reflejada por las altas desviaciones estándares, siendo hasta de tres veces las diferencias de expresión entre individuos. La expresión de la señalización del gen SOD fue estadísticamente menor en los grupos C4, I4 e I5 respecto al grupo con menor infección C3. No se presentaron diferencias significativas entre el

transcrito de la SOD en ostiones inyectados con *P. marinus* (Fig. 52).

La actina ha sido considerada como un gen de referencia debido a que participa en la formación del citoesqueleto, presumiendo que se transcribe constantemente para el funcionamiento esencial celular. Sin embargo, en nuestro estudio se obtuvo que *C. corteziensis* presentó baja expresión del transcrito ACT–β en los organismos con infecciones cuatro y cinco (C4, I4, I5) respecto a los organismos con la menor infección (C3).

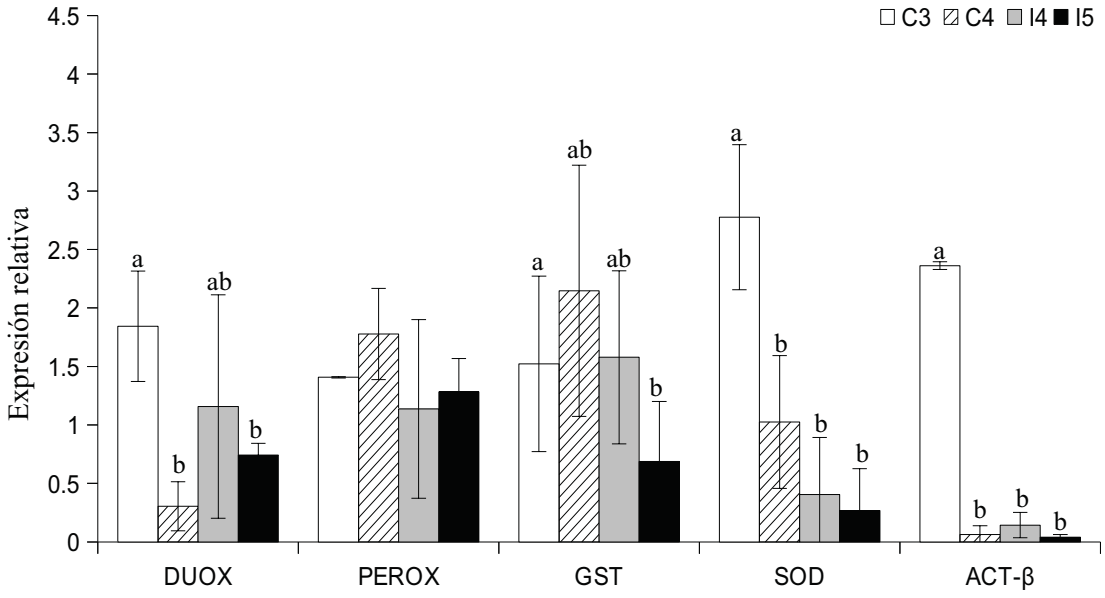


Fig. 52. Expresión relativa de DUOX, PEROX, GST, SOD y ACT–β normalizada con la media geométrica de RPL10, GAPDH y RPL8 de ostiones controles (C) con intensidades de *P. marinus* de tres (C3) y cuatro (C4) y de ostiones inyectados con *P. marinus* (I) que presentaron intensidades cuatro (I4) y cinco (I5). Las diferencias significativas se indican con diferentes letras sobre las barras de la media y la desviación estándar.

Los genes LPTNF, ECSIT y NF–K–INH que pudieran estar involucrados en el proceso de activación del factor NF–κβ fueron agrupados en la gráfica (Fig. 53) en donde se observa

que la expresión del receptor LPTNF y el receptor intermediario ECSIT de la ruta de señalización de los receptores toll, fue significativamente menor en los ostiones con infecciones cuatro y cinco (C4, I4, I5) con respecto a los ostiones con la menor infección (C3). No se presentaron diferencias significativas entre grupos al evaluar la expresión relativa del gen NF–K–INH.

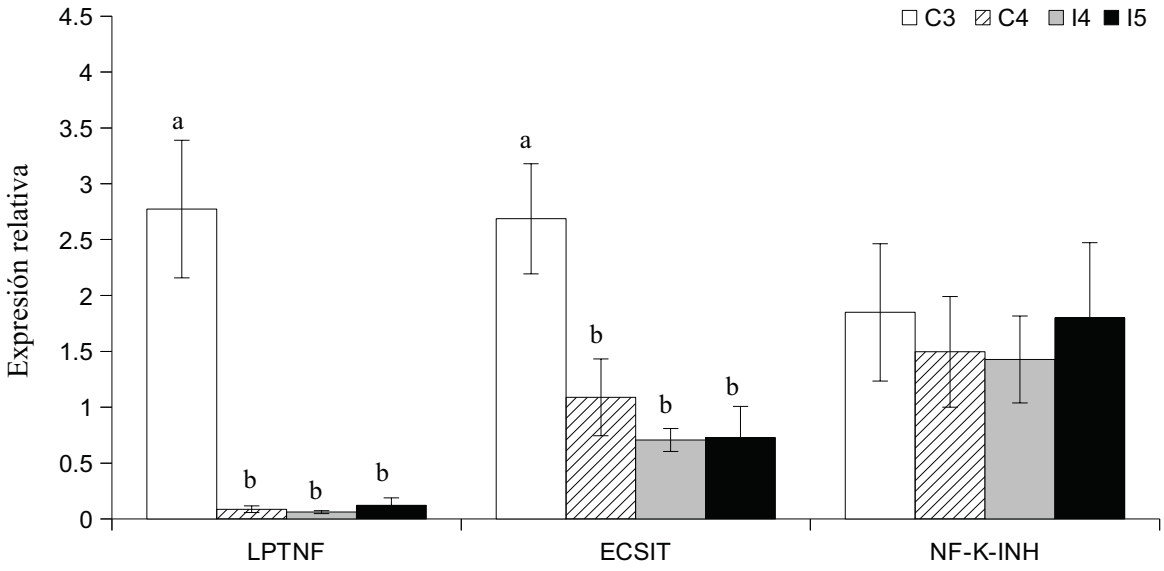


Fig. 53. Expresión relativa de LPTNF, ECSIT, NF–K–INH normalizada con la media geométrica de RPL10, GAPDH y RPL8 de ostiones controles (C) con intensidades de *P. marinus* de tres (C3) y cuatro (C4) y de ostiones inyectados con *P. marinus* (I) que presentaron intensidades cuatro (I4) y cinco (I5). Las diferencias significativas se indican con diferentes letras sobre las barras de la media y la desviación estándar.

Los genes que participan en la apoptosis como CAS8, CAS3, B–IAP, B–IAP2 y DNA–FRAG representados en la gráfica (Fig. 54), muestran que el gen de la kinasa CAS8 reguladora de la apoptosis presentó los menores niveles de expresión en organismos con infecciones 4 y 5 con respecto a ostiones con infección 3 (C3), sin embargo, la CAS3 que

puede ser controlada por inhibidores de apoptosis mostró los mismos niveles de expresión en las cuatro condiciones de infección. La expresión de los dos inhibidores de apoptosis fue menor en ostiones con altas infecciones (C4, I4, I5) con respecto a ostiones con baja infección (C3), se presentó mayor variabilidad intraespecífica para el B–IAP respecto a B–IAP2. El gen DNA–FRAG que se presenta al final de la apoptosis para llevar a cabo la fragmentación del DNA fue menor en los ostiones con infección 4 y 5 con respecto a los ostiones con las infecciones más bajas (C3).

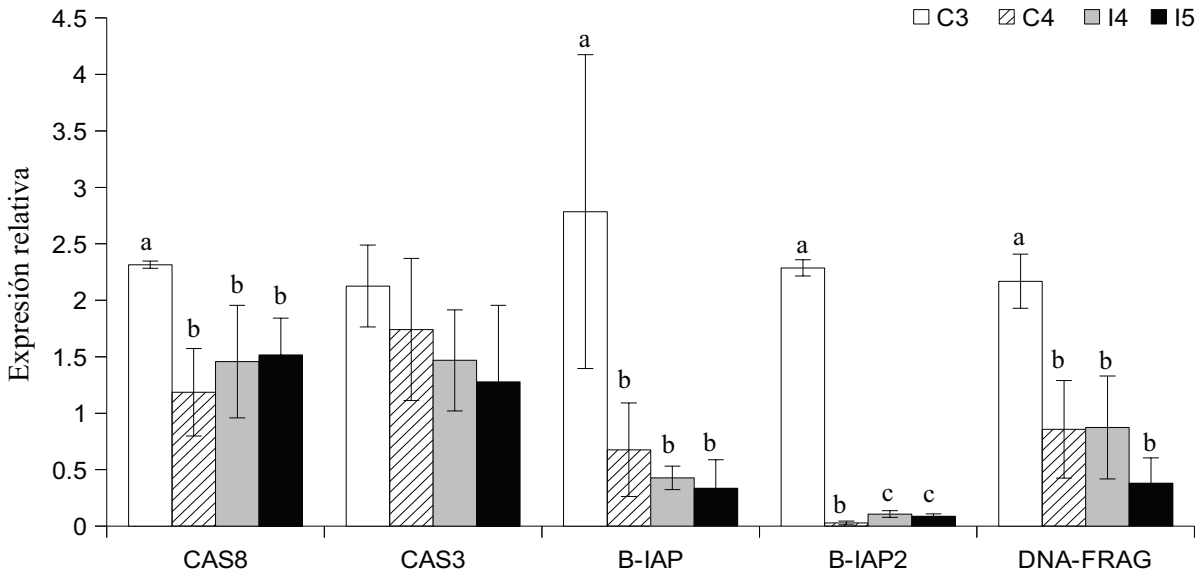


Fig. 54. Expresión relativa de CAS8, CAS3, B–IAP, B–IAP2 y DNA–FRAG normalizada con la media geométrica de RPL10, GAPDH y RPL8 de ostiones controles (C) con intensidades de *P. marinus* de tres (C3) y cuatro (C4) y de ostiones inyectados con *P. marinus* (I) que presentaron intensidades cuatro (I4) y cinco (I5). Las diferencias significativas se indican con diferentes letras sobre las barras de la media y la desviación estándar.

8 DISCUSIÓN

8.1 Prevalencia de *P. marinus* en *C. corteziensis* de Nayarit

El incremento de enfermedades en especies cultivadas es una preocupación importante debido al riesgo en la productividad económica causada por la globalización del comercio de organismos y productos acuáticos, generando un riesgo en dispersión de enfermedades emergentes a nivel mundial (Oidtmann et al., 2013). El calentamiento global es uno de los mayores retos ambientales, asociándose a la proliferación de patógenos debido al incremento de la temperatura del océano (Marcos-López et al., 2010). Sin embargo, el aumento de monitores sanitarios y el diagnóstico con herramientas de biología moleculares con mayor sensibilidad, han contribuido a la detección de patógenos en nuevos hospederos. El aumento del monitoreo de patógenos en el noroeste del Pacífico mexicano, permitió la detección del protozoario *P. marinus* en ostiones *C. corteziensis* de Nayarit, México (Cáceres-Martínez et al., 2008) y en *C. gigas* cultivado en Sonora, México (Enríquez-Espinoza et al., 2010). La distribución de *P. marinus* que estaba limitada a las costas del Atlántico norte, hacen necesario el conocimiento del origen del patógeno en el Pacífico así como la evaluación de la patogenicidad del protozoario. Con la finalidad de implementar medidas de manejo adecuadas de acuerdo al estado sanitario de cada zona de cultivo, es necesario la realización de monitores que evalúen la intensidad y prevalencia del patógeno. La prevalencia de *P. marinus* en *C. corteziensis* colectados para este estudio, fue mayor en Boca de Camichín (95.6%) que en Pozo Chino (77.4%), Nayarit. Las diferencias en la prevalencia de *P. marinus* entre ostiones de ambos esteros, pudiera estar influenciada por las densidades de cultivo en cada zona, siendo superior la densidad en Boca de Camichín (CESANAY, 2010) en donde se presentó la mayor prevalencia. Las diferencias de prevalencias de *P. olseni,* han sido registradas entre almejas de cultivo respecto a las poblaciones silvestres de *R. philippinarum* en Korea, en donde la densidad de cultivo es mayor (Park y Choi, 2001).

La densidad de cultivo pueden influir en la transmisión de *Perkinsus* porque el 5% de la infección total es liberada a través de las heces del hospedero, sin embargo, cuando el hospedero presenta intensidades menores a 500,000 cel/g de tejido húmedo, no ocurre la transmisión a través de heces del hospedero (Park et al., 2010). La mayor dispersión de *Perkinsus* proviene de ostiones muertos que propagan el patógeno al momento de la descomposición del tejido, y para que se desarrolle una rápida infección es necesario una alta dosis de *P. marinus* (Mackin, 1947). Para evitar la dispersión de *Perkinsus* se ha recomendado que los organismos con las conchas abiertas sean retirados del sitio de cultivo, y se evite la desecación y exposición al sol de los organismos cuando la marea baja para evitar el incremento de la temperatura. Cuando se presentan mortalidades, se sugieren movimientos de organismos a zonas con temperaturas más bajas y/o con bajas salinidades generadas por la incorporación de efluentes de agua dulce, evitando las condiciones óptimas para la proliferación del protozoario.

Las prevalencias de *P. marinus* que se habían registrado durante diciembre del 2006 a noviembre del 2007 en cultivos de *C. corteziensis* de Nayarit, fueron del 5% en ostiones de Boca de Camichín y del 1 al 6% en ostiones de Pozo Chino (Cáceres-Martínez et al., 2008). En marzo del 2008 se documentaron prevalencias del 6% en ostiones de Boca de Camichín, y de 3% en ostiones de Pozo Chino, y en junio y febrero del 2009 las máximas prevalencias fueron del 13% en Boca de Camichín y 10% en Pozo Chino (CESANAY, 2010). En nuestro estudio realizado en ostiones colectados de Nayarit en junio del 2010, las prevalencias fueron mayores (77 y 95%) a las registradas anteriormente, atribuido a que el diagnóstico fue realizado por PCR, a diferencia de las detecciones del 2006 realizadas por histología (Cáceres-Martínez et al., 2008) que es un método menos sensible, considerando importante la homologación de técnicas para el diagnóstico especie–específico.

La prevalencia de *P. marinus* registrada en el 2010 en ostiones de Nayarit, fue similar (60–100%) a lo encontrado en el primer registro de *P. marinus* en *C. virginica* de Laguna de Términos, Golfo de México (Burreson et al., 1994), las cuales disminuyeron al 70% de

febrero a mayo, 23% de junio a septiembre y del 7% de octubre a enero, con intensidades ligeras (<1 de la escala de Mackin) (Gullian-Klanian et al., 2008). Las prevalencias de *P. marinus* registradas en *C. corteziensis* en el 2010, también se asemejan a lo obtenido en *C. virginica* de Florida, Virginia y Nueva York (98-100%) (Oliver et al., 1998) en ostiones de 4 años de cultivo, mientras que los ostiones *C. cortezienisis* analizados en estudio fueron de aproximadamente 5 meses, indicando que la dispersión en los cultivos de *C. corteziensis* esta ocurriendo en ostiones juveniles.

A pesar de la alta prevalencia encontrada en *C. corteziensis*, hasta ahora no se han observado mortalidades en los cultivos de Nayarit, lo cual puede estar relacionado a la intensidad y virulencia del genotipo de *P. marinus.* Adicionalmente, el rápido crecimiento de *C. corteziensis* puede estar limitando la mortalidad debido a que la intensidad de *Perkinsus* se incrementa con la edad en ostiones (Calvo et al., 1996) y almejas (Villalba et al., 2005) que conllevan a la mortalidad a partir del segundo año de cultivo (Yang et al., 2010). *C. corteziensis* alcanza su tamaño comercial en menos de 13 meses, mientras que *C. virginica* de Nueva York alcanza la talla comercial (7.5 cm) a los 3 años de cultivo (Oliver et al., 1998).

8.2 Coinfecciones por *Perkinsus* sp.

El diagnóstico de *Perkinsus* por PCR pudiera ser especie–específico, sin embargo, los iniciadores utilizados amplifican los marcadores ITS y NTS de la mayoría de las especies del género *Perkinsus*, y las diferencias del tamaño de los fragmentos no son diferenciables. Mediante este tipo de diagnóstico se consideraba que solo una especie de *Perkinsus* infectaba a un hospedero, sin embargo, recientemente se han documentado co–infecciones de *P. marinus* y *P. cheasapeaki* en la almeja *Mya arenaria*, en el ostión *C. virginica* de Bahía Cheasapeake (Reece et al., 2008), y en la almeja *Ruditapes decussatus* de Francia (Arzul et al., 2012). Se desconoce si las co–infecciones son recientes, o el evento no había

sido identificado debido a que las técnicas de diagnóstico para *Perkinsus* sp. no son especie–específicas. A pesar de la simpatría de ostiones y almejas en Bahía Chesapeake, y que se ha demostrado que la transmisión de *Perkinsus* ocurre por diseminación en el agua, es difícil encontrar almejas infectadas por *P. marinus* en esta bahía (Reece et al., 2008).

Para verificar posibles co–infecciones por *Perkinsus* en *C. corteziensis,* se realizó el análisis de RFLPS–PCR de la región ITS que permite distinguir entre *P. marinus* y las especies cercanamente relacionadas como *P. olseni* y *P. chesapeaki* del Atlántico. Se obtuvo que todas las muestras presentaron únicamente el patrón de restricción esperado para *P. marinus*, a excepción de una muestra que presentó el patrón similar a *P. olseni,* sin embargo, la secuencia de este producto tiene alta similitud con *P. marinus.* Con estos resultados podemos concluir que en los ostiones analizados no se presentaron co–infecciones de *Perkinsus*. El utilizar enzimas de restricción en el producto de PCR, es un método de diagnóstico que evalúa la prevalencia y permite de forma rápida incrementa la identificación de posibles co–infecciones en todas las muestras.

8.3 Intensidad de *P. marinus* en ostiones cultivados en Nayarit

Los resultados indican que la prevalencia de *P. marinus* ha ido en aumento a partir del 2006 en *C. corteziensis* de Nayarit, sin embargo, la mayoría de los ostiones de Pozo Chino presentaron infecciones ligeras tanto en branquias como en el sistema digestivo. La variabilidad en el grado de infección que se presenta en ostiones de ambos esteros, puede indicar que la enfermedad aun no es estacionaria, y que nuevas infecciones están ocurriendo. La presencia de organismos no infectados y ligeramente infectados, sugieren resistencia intraespecífica en *C. corteziensis* ante *P. marinus.* Las altas infecciones corroboran que *C. corteziensis* es susceptible a ser infectado por *P. marinus*, sin embargo, hasta la fecha no se han presentado mortalidades en los cultivos debido a la perkinsosis, como en el caso de las altas pérdidas causadas por *P. marinus* en *C. virginica* de la costa del Atlántico en Estados Unidos.

8.4 Histopatología de ostiones de Nayarit

En Nayarit se encontraron ostiones con altas infecciones, sin embargo, no se observaron signos característicos de infecciones crónicas como: glándula digestiva transparente, branquias cortadas o postulas amarillentas en el tejido fresco (Almeida, 1999). Sugiriendo que *Perkinsus* podría estar en el ostión como partícula de transición debido la alta tasa de filtración de los moluscos bivalvos, y a la alta cantidad de mucus que contienen en las branquias para seleccionar partículas y formar pseudo–heces que evitan la entrada de patógenos. Para conocer si *C. corteziensis* internaliza a *P. marinus*, se realizaron cortes histológicos que permitieron identificar trofozoitos maduros de aproximadamente 25 µm de diámetro en el epitelio digestivo, y se observaron dentro del esquizonte un máximo de 4 células hijas.

Todas las muestras de Nayarit fueron revisadas por histológia, sin embargo, el protozoario únicamente fue observado en algunos organismos con infecciones altas debido a la baja sensibilidad de la técnica que dificulta la visualización en organismos con bajas infecciones bajas, a diferencia de la identificación de *P. olseni* que presenta un diámetro promedio de 40 µm que facilitan su observación. *P. marinus* fue observado internalizado en los hemocitos, y se presentaron inclusiones en epitelio digestivo, que es el tejido donde principalmente se observa a *Perkinsus.* A pesar de que *Perkinsus* puede infectar todos tejidos e incluso se ha observado en el manto, en el gonadocontucto y en la gónada de *C. virginica* (Reece et al., 2008), la visualización es común en el epitelio digestivo y en branquias (Park et al., 2010).

La visualización de *P. marinus* en los epitelios digestivos fue evidente porque se asocia a la proliferación o infiltración de células que se dirigen al sitio de infección, observando que en la mayoría de los ostiones la infección fue local. En branquias no se logró observar al protozoario, sin embargo, el análisis por PCR indicó que en la mayoría de los ostiones el protozoario se encontraba en branquias. Lo anterior se debe a que el tamaño del trofozoito

no logra ser distinguido de las células branquiales. Para corroborar el reconocimiento y la internalización de *P. marinus* en branquias de *C. corteziensis*, se realizaron hibridaciones *in situ* en individuos con infección clasificada con intensidad 4 de acuerdo a la escala de Mackin. Las hibridaciones fueron ligeras, sin embargo, se observaron células de *Perkinsus* intracelulares, corroborando que desde las branquias hay un reconocimiento por parte del hospedero, siendo las branquias en conjunto con el mucus en donde se lleva a cabo la primera estrategia de defensa, sorteando y eliminando partículas que pueden ser reconocidas como dañinas por el hospedero.

La hibridación obtenida fue baja, contrario a lo que esperado en un organismo con grado de infección 4, indicando que la intensidad de la infección cuantificada mediante FMT pudiera estarse sobrestimando, debido a que en FMT pueden sobrevivir algunos dinoflagelados con morfologías similares a *P. marinus* debido a su estrecha relación filogenética con la familia Perkinsidae (Almeida et al., 1999). Por lo anterior es recomendable realizar cuantificaciones con métodos más sensibles como la cuantificación del número de copias de cierto marcador molecular de *P. marinus* por qPCR.

8.5 Filogenia del ITS de *P. marinus* de Nayarit

A partir de las secuencias obtenidas del ITS del aislado de Nayarit, se obtuvo que todas las secuencias tienen mayor similitud con *P. marinus* que con cualquier otra especie de *Perkinsus*, sin embargo, se obtuvieron 23 polimorfismos en las 20 secuencias diferentes. El alto grado de polimorfismo en este protozoario también se ha observado en los 12 cultivos de *P. marinus* obtenidos a lo largo de costa este de EUA, en donde el ITS de *P. marinus* presentó 20 secuencias variantes con 25 sitios polimórficos. Debido a que en nuestro estudio los sitios de colecta de organismos comparten el mismo cuerpo de agua, se esperaba que el polimorfismo fuera menor al previamente registrado en la costa este del Atlántico, sin embargo, las caracterizaciones de los 12 genotipos fueron realizadas a partir

de cultivos *in vitro*, y para *P. marinus* de Nayarit se realizó a partir de ostiones infectados, lo que aumentan la posibilidad de obtener más variantes. El alto polimorfismo en *Perkinsus,* ha sido registrado en diferentes hospederos e incluso ha sido identificados a partir de un mismo cultivo *in vitro* (Dungan et al., 2002).

El ITS de *P. marinus* presentó varios sitios polimórficos, sin embargo, la mayoría de los productos clonados estuvieron representados por dos secuencias que difieren entre ellas por una transversión en la posición 447 que pudieran estar representando la variante A y variante B. Sugiriendo la existencia de dos variantes en el ITS de *P. marinus*. Las variantes A y B fueron encontradas en ostiones de ambos sitios, e incluso las dos variantes fueron encontradas en tres ostiones de Boca de Camichín y en dos ostiones de Pozo Chino. El polimorfismo intraespecífico puede ser explicado por las múltiples copias que presenta la región ITS y a las recombinaciones genéticas (Thompson et al., 2011).

A pesar del aislamiento geográfico con los genotipos de *P. marinus* de la costa este de EUA, la variante A tuvo alta similitud con los *P. marinus* de Texas (Txsc) y Maryland (MA, MD y EBPIC), y la variante B presentó mayor similitud con *P. marinus* de Carolina del Norte (NC) y Maryland Upper Bay (UBMD). La alta similitud de las secuencias ITS obtenidas en este estudio, sugieren la posible introducción de *P. marinus* por transporte de moluscos del Atlántico al Pacífico.

El ITS de *P. marinus* de Nayarit mostró alta similitud con los aislados clasificados como genotipo 1 de Nueva Jersey y Maryland, y con el genotipo 3 de Carolina del Norte, Louisiana y Texas. La virulencia del genotipo 1 ha sido clasificada como moderadamente virulencia, el genotipo 3 se consideró con virulencia media, mientras que la mayor virulencia fue presentada por el genotipo 8 (Bushek y Allen, 1996) que fue agrupado en un clado divergente a *P. marinus* de Nayarit. En resumen, nuestros resultados sugieren que *P. marinus* de Nayarit presentó alta similitud con los genotipos con baja y moderada virulencia, corroborado con el hecho de que a pesar de las altas prevalencias registradas durante Julio del 2010 en ambos esteros de Nayarit, no se reportaron mortalidades, sin

embargo, la virulencia de *P. marinus* de Nayarit debe ser evaluada con retos de infección comparando con los genotipos del Atlántico.

8.6 Filogenia del NTS de *P. marinus* de Nayarit

Las 14 secuencias obtenidas del NTS, presentaron diferencias en al menos un sitio nucleotídico, con un total de 30 sitios polimórficos de los cuales 20 fueron transiciones y 10 transversiones. Mediante el NTS la diferenciación con otras especies de *Perkinsus* fue más notoria, debido a que la similitud con *P. marinus* fue del 98%, y 85% con *P. olseni* que es la especie más cercana. La similitud con el NTS de *P. olseni* fue mayor a lo obtenido con el ITS, mostrando evidencias de que la especie presente en Nayarit no es *P. olseni*.

Mediante el análisis filogenético del NTS se obtuvo que las secuencias se agruparon en dos clados, similar a lo obtenido con las secuencias de la región del ITS. En el clado B las secuencias se agruparon con el genotipo de Texas, y las secuencias del clado A no se agrupan con algún genotipo, esto se debe a la limitación de información para la región NTS. A pesar de que *P. olseni* es la especie más cercana a *P. marinus*, el método de distancias tanto para el ITS como para el NTS muestra que cada especie se agrupa en un clado diferente.

8.7 Diversidad nucleotídic**a**

La diversidad nucleotídica tanto para el ITS como para el NTS fue similar entre *P. marinus* de los dos esteros, lo que indica que el polimorfismo es geográficamente homogéneo. Al descomponer el ITS se obtuvo que el ITS2 es más variable seguido del 5.8S, y finalmente el ITS1 fue el que presentó la menor variabilidad. La diversidad nucleotídica de 485 pb del ITS de *P. marinus* de la costa del Atlántico fue mayor (0.00712) (Brown et al., 2004) que lo encontrado en nuestro estudio para *P. marinus* de Nayarit (0.00326), y la diferencia entre la diversidad inter–específica entre *P. marinus* (GenBank JQ266231) y *P. olseni* (GenBank

U07701) fue de un orden de magnitud.

El marcador con la mayor diversidad fue el NTS, sugiriendo que la alta variabilidad intraespecífica que presenta esta región permite diferenciar genotipos. Y la región ITS que es más conservada, es adecuada para llevar a cabo el diagnostico especie–especifico.

8.8 Identificación, prevalencia e intensidad de *P. marinus* en *C. corteziensis* de BCS

En este estudio se registró por primera vez, la presencia de *P. marinus* en un cultivo de *C. corteziensis* de BCS que presentó 100% de identidad con el ITS de *P. marinus* de Nayarit (JQ266240) agrupado filogeneticamente (Escobedo-Fregoso et al., 2013) en el clado de *P. marinus* de los genotipos clasificados con baja y media virulencia, separados del clado de los genotipos de *P. marinus* de Virginia clasificados como altamente virulentos debido a las mortalidades causadas (Bushek y Allen, 1996). Debido a que los patógenos tienden a variar rápidamente para adecuarse a las condiciones de sus hospederos, la interacción entre ostiones resistentes a la enfermedad y la virulencia diferencial de los aislados de *P. marinus* han conferido sobrevivencia de ciertas lineas génicas, por lo tanto no es posible aseverar la virulencia de este protozoario ante un nuevo hospedero.

P. marinus que ha sido detectado en *C. corteziensis* de Nayarit y *C. gigas* de Sonora (Escobedo-Fregoso et al., 2013; Cáceres-Martínez et al., 2008; Enríquez-Espinoza et al., 2010), fue identificado en *C. cortezienisis* de BCS, obteniendo que el 100% (32/32) de los ostiones de BCS colectados en 2012 presentaron *P. marinus*, el cual fue mayor al 83.34% (45/54) registrado en el muestro realizado en el 2010 en Nayarit. Sin embargo, la intensidad de la infección en ostiones de BCS fue baja (1–2) con respecto a los organismos de Nayarit que presentaron infecciones altas (1–5). Las diferencias en las intensidades de *P. marinus* pueden estar influenciadas por las intensidades de cultivo que son mayores en Nayarit que en BCS, adicionalmente la temperatura del agua en Nayarit es mayor que en BCS, y las condiciones desfavorables como la contaminación en los cuerpos costeros de

Nayarit es mayor, a diferencia de las aguas de BCS con baja contaminación del agua debido al bajo desarrollo industrial y acuícola. Cabe mencionar que la detección de un patógeno en un nuevo hospedero no asegura que el hospedero desarrolle la enfermedad, siendo necesarias las exposiciones ante el patógeno en condiciones de laboratorio.

En la amplia distribución de *C. virginica* en la costa este del Atlántico de Estados Unidos se han presentado diferencias en la prevalencias de *P. marinus*, sin embargo, en cultivos de Virginia y Texas las prevalencias alcanzan hasta el 100%. A pesar de las altas prevalencias en *C. virginica* del Golfo de México*,* las condiciones son propicias para la sobrevivencia de *C. virginica*, a diferencia de los cultivos del Atlántico norte en donde se presentan altas mortalidades (Bushek y Allen, 1996).

8.9 Susceptibilidad de *C. corteziensis* ante *P. marinus*

La especie *C. gigas* que es la mayor cultivada en el noroeste de México, presenta altas tasas de mortalidad cuando la temperatura del mar se incrementa debido a que es susceptible a ciertos cambios ambientales (Samain y McCombie, 2008), a diferencia de la especie endémica *C. corteziensis* nativa del noroeste de México que puede ser una alternativa de cultivo. Hasta el momento los cultivos de *C. corteziensis* no han presentado mortalidades con los incrementos de temperatura y presencia de diferentes patógenos (Cáceres-Martínez et al., 2010).

El incrementó de la temperatura propició el aumento de la intensidad de la infección en ostiones de BCS que al inicio del experimento presentaron intensidades entre 1–2, y cuando la temperatura se incrementó de 20°C a 26°C, el 68% de los ostiones sobrevivientes presentaron intensidades de 4. La alta temperatura es una de las principales variables ambientales que participan en la proliferación de *P. marinus*, siendo entre 28–32°C y salinidades de 25–30‰ las condiciones óptimas de proliferación en condiciones de cultivo *in vitro* (Gauthier y Vasta, 1995).

Los niveles de infección en ostiones inyectados con *P. marinus* fueron intraindividualmente diferentes a pesar de cohabitar en el mismo estanque, en donde más del 50% presentaron nivel de infección 5, y un menor porcentaje presentó niveles 3 y 5. Este patrón ha sido observado en ostiones inyectados con Perkinsus, e incluso algunos ostiones presentan menores dosis de las inoculadas inicialmente, evidenciando la eliminación del patógeno. En ostiones inyectados con diferentes aislados de *Perkinsus*, se ha observado que los aislados del Atlántico son más difícil de eliminar que los del Golfo (Bushek y Allen, 1996), lo cual puede estar relacionado con la patogenicidad entre genotipos.

La baja mortalidad en ostiones inyectados con solución salina (43.6%) respecto a los ostiones inyectados con *P. marinus*, demuestra que *C. corteziensis* es susceptible a la infección a altas dosis (5.4×10^6) de *P. marinus* a diferencia de *C. gigas* que presenta resistencia al ser inyectado (10^6) con dosis similares (Tanguy et al., 2004). Las altas intensidades en ostiones de Nayarit sugieren que *C. corteziensis* puede sobrevivir a altas dosis de *P. marinus* cuando la proliferación se incrementa con el tiempo de manera natural. En ostiones expuestos a dosis de *Perkinsus* que se presentan en el medio natural, se ha observado que en condiciones de laboratorio ocurren mortalidades inexplicables a los dos meses de ser expuestos (Bushek y Allen, 1996).

A pesar de que no se han presentado mortalidades en los cultivos de *C. corteziensis*, se desconoce que está sucediendo en los ostiones de los bancos naturales fijados al manglar de donde se colectan las semillas de ostión para cultivo. En el medio natural se ha presentado decrementos de las poblaciones de *C. virginica* en Bahía Delaware, Chesapeake, que no se presentan en las poblaciones del Golfo de México a pesar de que ambas poblaciones coexisten con *P. marinus*, atribuido a que las poblaciones del Golfo alcanzan más rápido la madurez sexual debido a las temperaturas superiores respecto a las aguas frías del Atlántico norte, lo que genera se reproduzcan antes de que el patógeno sea letal (Bushek y Allen, 1996).

8.10 Genes de referencia

Los mecanismos de respuesta inmune de *C. corteziensis* son desconocidos, por lo que este estudio se enfocó en conocer la respuesta global a nivel transcriptómico de *C. corteziensis* ante diferentes condiciones de infección por *P. marinus.* En especies no modelo como *C. corteziensis* se carece de información genómica, siendo una alternativa el uso de información heteróloga para realizar estudios transcripcionales. Para este estudio se utilizó el microarreglo del invertebrado *D. melanogaster* que ha sido modelo de estudio para entender la interacción hospedero–patógeno, como en el caso del estudio de los factores requeridos de la mosca para el crecimiento del protozoario *Plasmodium,* causante de la malaria en humanos (Péan y Dionne, 2014). *D. melanogaster* presenta procesos de respuesta inmune homólogos a los ostiones en respuesta a protozoarios intracelulares como la señalización del factor nuclear NF–κb que no se ha identificado en otros invertebrados como *Caenorhabditis elegans* (Zhang y Yu, 2011).

Para realizar una adecuada cuantificación de transcritos por qPCR en especies no modelo y evitar una inadecuada interpretación biológica (Tricarico et al., 2002), es importante seleccionar genes de referencia estables entre las condiciones y tejidos a evaluar (Llera-Herrera et al., 2012; De Santis et al., 2011). De una alta cantidad de genes candidatos para ser evaluados como genes de referencia para *C. corteziensis*, se seleccionaron genes de procesos biológicos cuya expresión se mantiene estable bajo diferentes condiciones como son los genes ribosomales, genes de elongación y genes del citoesqueleto. Mediante el análisis de estabilidad relativa los genes RPL10, GAPDH y RPL8 fueron los más estables entre las diferentes condiciones de infección, desconociendo la estabilidad de estos genes entre tejidos. Se ha observado que GAPDH presenta inestabilidad entre tejidos de humanos (Barber et al., 2005), y en *C. gigas* hay mayor expresión de GAPDH en el músculo aductor (Dheilly et al., 2011). La inestabilidad fue obtenida para el gen ACT–β que es ampliamente utilizado como gen normalizador, presentando bajos niveles de expresión en ostiones con

infecciones cuatro y cinco, atribuido a su participación en la formación del fagosoma en presencia de patógenos intracelulares en infecciones tempranas. La sobre–expresión del gen *actin beta 1* se ha observado en ostiones *C. gigas* infectados con herpesvirus OsHV–1 (Jouaux et al., 2013), así como la baja estabilidad de actina en *Ostrea edulis* infectado con *Bonamia ostreae* (Morga et al., 2010).

A pesar de que en los tres microarreglos el transcrito de actina no presentó expresión diferencial entre condiciones, la inestabilidad indica que hay expresión diferencial explicada por las diferentes isoformas de actina. Uno de los artefactos se debe a que al momento de realizar la búsqueda de actina de *D. melanogaste* mediante *blast* en el transcriptoma de *C. corteziensis,* se descartó el mejor *hit* cuando el transcrito no presentaba la longitud adecuada para el diseño de iniciadores para la cuantificación por qPCR, por lo que el transcrito que el microarreglo arrojó no fue el mismo que se cuantificó por qPCR. Para transcritos con diferentes isoformas como actina y tubulina es importante el diseño específico de la isoforma, evitando cuantificaciones de dos transcritos.

8.11 Procesos de respuesta inmune de *C. corteziensis* ante *P. marinus*

El objetivo de este sección fue identificar los procesos defensa que el ostión utiliza ante *P. marinus.* Una vez identificados los mecanismos de respuesta se analizó la interacción de los genes que están interviniendo en cada mecanismo, con el objetivo de identificar genes específicos ante la enfermedad. La información generada para *C. corteziensis* permitió conocer los transcritos que participan en las rutas de señalización y cascadas de transcritos, debido a que estos procesos no se llevan a cabo igual entre organismos. Como la caspasa 3 que en mamíferos es regulada por los inhibidores de apoptosis, y en moluscos al parecer este gen no participa en esta regulación (Hughes et al., 2010). Así mismo, se han identificado transcritos que no estaban descritos en moluscos como *Ecsit* (Zhang et al., 2012), *Myd88* (Zhang et al., 2011) y señalizadores de complemento que participan en la

respuesta inmune (Prado-Alvarez et al., 2009), siendo la técnica de microarreglos una herramienta que genera una panorámica global, y permite la identificación de nuevos genes en especies no modelo.

Los dos cultivos de *C. corteziensis* presentaron diferentes genes que participan en la respuesta inmune. Aunque no se puede determinar si estos genes son específicos a la respuesta ante *P. marinus* o a las diferencias ambientales como son la temperatura que es mayor en Nayarit con respecto a BCS, las densidades de cultivo que son mayores en Nayarit, y en BCS únicamente hay una granja de cultivo que está en un sitio prístino, las diferencias en la calidad de agua, las diferencias entre patógenos que fueron observados en ostiones de Nayarit a diferencia de BCS, en donde los ostiones de Nayarit presentaron prevalencias altas de *Nematopsis* sp (datos no mostrados).

En ostiones de Nayarit, los procesos biológicos de respuesta inmune que fueron estadísticamente significativos de acuerdo al análisis de enriquecimiento de términos fue la respuesta inmune (Fig. 38). Dentro de este proceso se encontraron ocho términos ontológicos que participan en diferentes mecanismos de respuesta inmune de acuerdo al nivel de infección (Fig. 41). Los procesos de respuesta inmune identificados en los microarreglos bajo la condición designada como "infección alta" en ostiones de Nayarit (I4), fueron los proceso de regulación negativa de apoptosis que impiden la muerte celular que puede ser inhibida por patógenos para permanecer dentro de la célula (Sokolova, 2009). En la regulación negativa se encontraron cinco genes de los cuales *bruce* (CG6303) que es homólogo a *Baculoviral IAP* de *C. gigas,* fue encontrado sobre–expresado en la condición de infección cuatro en ostiones de Nayarit, en ostiones de BCS con nivel tres y en ostiones experimentales con nivel de infección cinco. Aunque este gen no fue cuantificado por qPCR se encontró en organismos con infecciones altas, por lo tanto puede ser un gen regulado por el patógeno para evitar la apoptosis.

Deterin (CG12265) que también participa en la regulación negativa de apoptosis (Jones et al., 2000) fue homologó en *C. gigas*, y se encontró sobre–expresado en ostiones con

infección cuatro en Nayarit. Sin embargo, cuando se cuantificó la expresión de *B–IAP* (*deterin*) en las muestras experimentales, se obtuvo mayor expresión en ostiones con infección tres respecto a ostiones con infecciones cuatro y cinco. Esta posible incongruencia puede explicarse por el alto contenido de isoformas que se obtuvieron para este gen al secuenciar el transcriptoma de *C. corteziensis.* A pesar de que al momento de realizar la búsqueda de *B–IAP* (CG1226) en el transcriptoma de *C. corteziensis* se eligió para este transcrito el mejor hit, se corroboró en la base del transcriptoma de *C. corteziensis* que el siguiente *blast–hit* pertenece a una isoforma del *IAP* el cual tiene una expresión de 4.6 veces más en ostiones con infección baja respecto a ostiones con alta infección, y a diferencia del transcrito que se cuantificó por qPCR presentó en la base del transcriptoma una expresión de 2.5 veces menos en en ostiones con infección baja respecto a ostiones con alta infección. El alto contenido de isoformas para diversos transcritos regulado por splicing alternativo (Syed et al., 2012) es una de las ventaja adaptativa que realizan los invertebrados cuando son expuestos ante diferentes patógenos.

En contra parte el *inhibidor de apoptosis 2* (CG8293) se encontró en organismos con baja infección procedentes de BCS, y en ostiones experimentales con infección tres y cuatro no se presentaron diferencias de expresión para *BIAP– 2*. La expresión de *BIAP– 2* en ostiones experimentales con infección 3 y 4 presentaron en el microarreglo un Z–score de 0.04 que indica que la expresión fue igual en las dos condiciones, al igual que en ostiones de Nayarit que presentan un Z–score de -0.23. Sin embargo la expresión relativa de *BIAP– 2* fue mayor en ostiones experimentales con infección tres, considerando que el *inhibidor de apoptosis 2* se transcribe en bajas infecciones. La inhibición de la apoptosis en ostiones con baja infección puede relacionarse con la contra parte que es el aumento de la caspasa 8 que induce la apoptosis cuando se inicia la infección por *Perkinsus*, desconociendo si la inhibición de apoptosis es un mecanismo que el ostión realiza para regular el exceso de transcritos que provocan la muerte celular, o se debe a la regulación de la apoptosis por parte del patógeno para impedir la muerte celular y poder proliferar.

En ostiones de Nayarit con infección uno (I1) se encontraron sobre–representados los procesos de respuesta inmune y respuesta inmune innata, dentro de estos procesos se agruparon genes como *hemese* (CG31770) que participa en la encapsulación, el gen de reconocimiento de peptidoglucanos CG32042 que participa en el reconocimiento de bacterias, algunos señalizadores toll como *kenny* (CG16910), *pellino* (CG5212), *18 wheeler* (CG8896) que participan en la transmisión de señales para la activación de la traslocación de NF–κβ (Aderem y Ulevitch, 2000). A pesar de que se encontró sobre–expresión de receptores toll, no se encontraron los activadores de NF–κβ, por lo tanto la activación de NF–κβ es igual para ambas condiciones de infección.

En los mecanismos de defensa en ostiones de Nayarit con infección cuatro (I4) se encontraron sobre–expresados los genes *ECSIT* y *MyD88* (Zhang et al., 2012; Zhang, et al., 2011) que desencadenan la degradación de *cactus* activando NF–κβ que participa en la transcripción de genes de respuesta inmune en *D. melanogaster* (Aderem y Ulevitch, 2000) estos genes se han encontrado sobre–expresados en ostiones y almejas infectadas por patógenos intracelulares. La sobre-expresión de los adaptadores *ECSIT* y *MyD88* sugieren la traslocación nuclear del NF–κβ promoviendo la transcripción de genes de respuesta inmune en organismos con altas infecciones de *P. marinus*.

En ostiones de BCS los procesos biológicos de respuesta inmune que fueron estadísticamente significativos de acuerdo al análisis de enriquecimiento de términos, fue la organización de los microtubulos del citoesqueleto (Fig. 39) que está asociada a la re–estructuración de la célula para fagocitar, el proceso de comunicación celular también fue significativo, sin embargo, los términos de respuesta inmune no se presentaron. Profundizando dentro de los términos generales se encontraron nueve categorías que involucran genes de respuesta inmune para ambas condiciones de infección.

Los ostiones de BCS con mayor infección (I3) sobre–expresaron señalizadores toll (toll signaling pathway) y citocinas que están implicados la proliferación celular y activación del factor NF–κβ (Akira y Takeda, 2004), también se sobre–expresaron transcritos

implicados en el proceso de reparación al DNA que evitan que ocurra la muerte celular por apoptosis. Dentro de los receptores se encontró el señalizador *pellino* y su ligando endógeno *spaetzle 4* (CG14928), a pesar de que se la cascada de señalización es Toll–pelle–dTRAF–cactus–Dif en mamíferos, se ha sugerido que *pellino* pudiera activar por si solo a NF–κβ (Jiang et al., 2003), y que *pellino2* modula la señalización por lipopolisacáridos que pudieran ser activados por los LPS de *P. marinus.* El alto número de genes relacionados con la transcripción de NF–κβ, sugiere que este mecanismo activa la migración de hemocitos del ostión hacia el sitio de infección para contrarrestar la infección mediante la internalización de *P. marinus* para ser fagocitado. En estos organismos (I4) se encontró dentro del proceso oxido–reducción a *peroxidasin* que es homólogo a la *mieloperoxidasa* en humanos, que participa en la fagocitosis reduciendo el peróxido de hidrógeno, y en defensa del hospedero (Nelson et al., 1994). La proteína que es transcrita por *peroxidasin* es un antioxidante que protege al organismo del estrés oxidativo, se han encontrado varias isoformas de *peroxiredoxin* en donde la *Prx–1* protege al parásito contrarrestando las ROS producidas por el hospedero y *Prx–2* participa en las señales redox y en la reducción de ROS (Kumagai et al., 2006).

En ostiones experimentales los procesos biológicos de respuesta inmune que fueron estadísticamente significativos de acuerdo al análisis de enriquecimiento de términos fue la autofagia para ambas condiciones de infección, siendo mayor el número de genes en ostiones I3 (Fig. 40). En ostiones inyectados con agua salina que presentaron la categoría de infección tres (C3) se identificaron genes de transporte vesicular, genes en respuesta ante el daño del ADN y genes de autofagia, todos estos procesos participan en la muerte celular por autofagia, que es la segunda estrategia de defensa ante el estrés oxidativo (Moore et al., 2006). Este mecanismo de muerte celular, participa en la remoción de organelos redundantes importantes para la invasión de los parásitos de la malaria y en la eliminación de patógenos intracelulares (Mansilla-Pareja y Colombo, 2013). Es un mecanismo de muerte celular como la apoptosis y necrosis, combatiendo enfermedades

como el cáncer, desordenes neurodegenerativos, enfermedades de almacenamiento lisosomal contra infecciones causadas por parásitos, bacterias o virus. Sin embargo, la autofagia es manipulada por agentes infecciosos para permitir la invasión del patógeno y la sobreviviencia de las células del hospedero como las bacterias *Mycobacterium tuberculosis* y *M. leptospirae* que escapan del compartimento fagosomal e invaden el citosol (van der Wel et al., 2007).

Algunos adaptadores de la autofagia, como *p62* y *NDP52* participan en el reconocimiento de bacterias como *Salmonella* (Mansilla-Pareja y Colombo, 2013), y las proteínas involucradas en la autofagia son *ATGs.* La forma común de autofagia no selectiva es la macroautofagia en la cual una porción del citoplasma con varios organelos son aleatoriamente rodeados por una estructura formando una doble membrana denominada fagóforo, esta estructura desarrolla una doble membrana vesicular denominada autofagosoma que se fusiona con la membrana de las vesículas y los lisosomas resultando en el autolisosoma, y los productos de degradación son liberados al citosol vía permeasas. Un factor crucial de señalización es la *Ser/Thr kinasa TOR*, esta proteína kinasa es responsable del balance entre la síntesis y degradación en la autofagia (Brennand et al., 2011). La alta expresión de genes relacionados con la autofagia han sido sugeridos como firmas transcriptómicas previas a la mortalidad de líneas génicas de *C. gigas* susceptibles (Chaney y Gracey, 2011).

La señalización de citocinas también se representó en los ostiones C3, sin embargo, únicamente se identificó sobre–expresión de un receptores tipo toll (CG1975) y no se obtuvieron activadores para el NF–κβ. La activación del factor NF–κβ tampoco se encontró sobre–expresado en ostiones con infección I5, desconociendo si la activación está ocurriendo en ambas condiciones, sin embargo, en ostiones de Nayarit con infección 4 y en ostiones con infección 3 se presentaron transcritos que indican la activación de NF–κβ, por lo que se sugiere que en las dos condiciones de infección experimental (C3, I5) está ocurriendo la traslocación de NF–κβ pero la expresión entre condiciones no es diferencial.

En estos organismos también se identificaron genes de respuesta a estrés oxidativo, resultado de la sobre–producción de radicales libres que pudieran ser producidos para destruir al patógeno.

Los organismos inyectados con *P. marinus* (I5), mostraron expresión diferencial en la categoría de genes oxido–reducción que se incrementa cuando se lleva a cabo la fagocitosis, activando la primera estrategia de defensa que es la producción de enzimas antioxidantes como las SOD (CG11793) para contrarrestar el daño por estrés oxidativo.

Genes relacionados a la fagocitosis fueron identificados en los tres microarreglos bajo las dos condiciones de infección. Indicando que en las seis condiciones de infección por *P. marinus*, *C. corteziensis* está internalizando al patógeno, sin aseverar la destrucción del protozoario, debido a que se ha visto en otros hospederos que la fagocitosis no es efectiva, siendo la internalización una estrategia de proliferación de ciertos patógenos intracelulares (Mansilla-Pareja y Colombo, 2013; Péan y Dionne, 2014; Sokolova, 2009).

El proceso de la organización estructural de la actina estuvo representada en lo ostiones I1 de Nayarit y ostiones I2 de BCS, indicando que la sobre–expresión de estos genes ocurrió en ostiones con infecciones bajas. Lo cual concuerda con la sobre–expresión de actina que se encontró en los organismos C3 en condiciones experimentales, siendo la actina un participador en la restructuración del citoesqueleto para llevar a cabo la internalización del patógeno (May y Machesky, 2001).

8.12 Inhibidores de serine proteasas

Los niveles de expresión del *ISP* fue menor en ostiones con las mayores infecciones (C3) respecto a los ostiones con la menor infección (C3), y la expresión del *ISP* se transcribió tanto en infecciones naturales como en infecciones generadas por inyección del patógeno. Las altas infecciones por *P. marinus* en los ostiones C3 pueden ser atribuidas a la disminución de los ISP en *C. corteziensis* que evitan la proliferación de *P. marinus* en *C.*

virginica resistentes ante *Perkinsus.* Los ISP del hospedero se unen a las proteasas subtilsin y perkinsis de *Perkinsus* que degradar las proteínas del hospedero adquiriendo nutrientes para el funcionamiento y proliferación del patógeno (Joseph et al., 2010; La Peyre et al., 2010). Aun cuando en nuestro trabajo se cuantificó la expresión de transcritos de ISP en branquias que presentan menor síntesis respecto a la glándula digestiva (La Peyre et al., 2010), los transcritos del ISP en branquias de *C. corteziensis* se encontraron en todos los organismos analizados, a diferencia de *C. virginica* que en algunos individuos no se ha encontrado expresión de *cvSI* (La Peyre et al., 2010). A pesar de que los inhibidores que secretan los ostiones incrementan la resistencia ante patógenos como se ha visto en *C. gigas* que es resistente a *P. marinus* (Romestand et al., 2002), se ha visto que no son suficientes para prevenir la infección por *P. marinus*, sugiriendo que otros mecanismos de respuesta inmune intervienen.

8.13 Genes que participan en la fagocitosis

Los menores niveles de expresión del transcrito *Duox* o NADPH–oxidasa se presentaron en ostiones con infecciones cuatro y cinco. La sobre–expresión de este transcrito también fue encontrada en en el arreglo C en ostiones con infección baja (C3), corroborando los resultados entre ambas técnicas. A pesar de que en todas las condiciones de infección de *C. corteziensis* se presentaron genes relacionados a la fagocitosis, los altos niveles de *Duox* sugieren mayor internalización en organismos C3 con baja infección. La enzima NADPH–oxidasa participa en la quimiotaxis y actúa en infecciones tempranas para atacar al patógeno y limitar su crecimiento. La temprana migración hacia el sitio de infección en el pez zebrafish infectado con el hongo *Candida albicans* son un fuerte indicador de sobrevivencia (Brothers et al., 2013).

Adicionalmente la enzima NADPH–oxidasa participa en el estallido respiratorio catalizando el radical libre superoxido el cual es dismutado a peróxido de hidrógeno,

producido en el fagosoma para destruir patógenos en moluscos (Buggé et al., 2007). Sugiriendo que la alta expresión de NADPH–oxidasa en ostiones C3 estuvo relacionada con la alta expresión del transcrito SOD (contig_1230), siendo menor en los organismos con mayores infecciones (C4, I4, I5). La no correlación entre la cuantificación del transcrito SOD y el análisis de microarreglos, se deben a que al realizar la búsqueda de la SOD CG11793 de *D. melanogaster* en la base del transcriptoma de *C. corteziensis* no se eligió el mejor *blast–hit* para ser cuantificado por qPCR porque presentó mayor similitud con la SOD isoforma 3 de *D. melanogaster,* y no presentó homología con *C. gigas*, a diferencia del transcrito de la SOD cuantificado por qPCR (contig_1230) que tuvo homología con *C. gigas*. La expresión diferencial obtenida mediante RNA–seq muestra que el contig_1230 fue 8.2 veces mayor en C3 que en I5, y el contig_90215 es 2.2 mayor en I5 respecto a C3. Con estos resultados se corroboró la relación entre los resultados obtenidos mediante microarreglos y RNA–seq, y entre RNA–Seq y qPCR. Las diferencias entre resultados se deben a las distintas isoformas cuantificadas por qPCR considerando importante el conocimiento previo al diseño de iniciadores de la variación del transcrito a cuantificar.

La expresión de *peroxidasin* estuvo sobre–expresado en el micoarreglo B en ostiones con infección baja (I2), sin embargo, no se presentaron diferencias entre condiciones de infección en ostiones experimentales. *Peroxidasin* que interviene en la destrucción de células que están programadas a muerte así como proteger al organismo de material extraño (Nelson et al., 1994) contrarrestando las ROS. Los niveles de expresión de GST fueron diferentes entre ostiones con los extremos de infección (C3 vs I5), en donde los ostiones con alta infección presentaron menor transcripción de SOD, y GST para contrarrestar el daño por estrés oxidativo. El alto contenido de antioxidantes se ha encontrado en lineas de *C. gigas* resistentes a las mortalidades (Fleury et al., 2010), dado a que el aumento de ROS producida por condiciones anómalas como la infección por patógenos es contrarrestada con el incremento de los niveles de transcritos de enzimas antioxidantes.

Los niveles de expresión de *ACT–β* fueron menores en ostiones con infecciones cuatro y cinco, lo cual estuvo relacionado con lo obtenido en los microarreglos A y B en donde el proceso de organización estructural de la actina estuvo sobre–representado en ostiones con baja infección. Relacionado con la fagocitosis debido a la re–estructuración organizacional del citoesqueleto para internalizar patógenos (May y Machesky, 2001). La sobre–expresión de este gen ha sido identificado en *C. gigas* en presencia de herpesvirus sugiriendo que la internalización y movilización del del virus es cortical actin–dependiente (Jouaux et al., 2013).

8.14 Genes que participan en la señalización del proceso inflamatorio

Los niveles de expresión de *TNF* que participa en la proliferación causando inflamación y/o puede activar la muerte celular por apoptosis carente de inflamación, fueron menores en ostiones con infecciones cuatro y cinco. Durante la señalización, el receptor *TNFα* se asocia con TRAF6–ECSIT–cactus–NF–κβ transcribiendo genes de sobrevivencia. La alta expresión de *TNF* en ostiones con baja infección (C3) estuvo relacionada con la activación de la *caspasa 8*, sin embargo, se encontraron bajos niveles de *caspasa 3*, y altos niveles de *ECSIT* que sugieren que la apoptosis está siendo controlada por el NF–κβ para evitar la muerte celular por apoptosis.

Se esperaba que los organismos con mayores infecciones presentaran altos niveles de expresión de *TNFα* y *ECSIT* como se han encontrado en *C. gigas* en presencia de *Vibrio anguillarium* (Zhang et al., 2012), que desencadenan la producción de citocinas pro–inflamatorias como respuesta temprana a infecciones. Y con los altos niveles de TNF, se esperaba que el NF–K–INH o *cactus* (Wang, 1998) fuera mayor en los ostiones con baja infección, sin embargo, se encontraron los mismos niveles de los transcritos del represor. Estas contradicciones indican que el reconocimiento de *P. marinus* no es únicamente por el *TNF* de *C. corteziensis,* considerando que el patógeno pudiera ser identificado por otros

receptores como: FAS o TRAIL o 18 8–wheeler para activar NF–κβ.

8.15 Genes implicados en la apoptosis

En organismos con infección cuatro y cinco presentaron los menores niveles del iniciador de apoptosis TNF y de la CAS8 que inducen la actividad de la proteasa CAS3 critica para la fragmentación del DNA vía extrínseca (Zhang et al., 2011). A pesar de que la CAS8 fue menor en organismos con altas infecciones (C4, I4, I5), los niveles de expresión de CAS3 fueron iguales en todas las condiciones de infección. Los bajos niveles de CAS3 en organismos con baja infección se relacionan con los altos niveles de expresión de los IAP1 e IAP 2 que regulan la inhibición de CAS3 y son activados por el NF–κβ (Wang, 1998) relacionado con el incremento de los receptores LPTNF y ECSIT que participan en la activación de NF–κβ (Zhang et al., 2012).

Los transcritos de CAS3 fueron igual entre las cuatro condiciones de infección, indicando la inhibición de la señalización de caspasas que había sido activada vía CAS8 en ostiones C3. A pesar de la inhibición vía extrínsica, el transcrito que participa en la fragmentación del DNA fue mayor en ostiones C3, sugiriendo que la apotopsis se está llevando a cabo vía intrínseca provocada por los altos niveles de NADPH que se presentaron en los organismos con bajas infecciones, esta vía de apoptosis es independiente de las CAS3. La efectiva apoptosis en los organismos C3 a diferencia de los ostiones con altas infecciones, puede estar contribuyendo a que el protozoario no prolifere. Esta respuesta se ha obtenido en organismos infectados con *P. marinus* en donde la apoptosis es una respuesta que ocurre en las primeras horas continuando con un decremento de apoptosis (Hughes et al., 2010). En organismos naturalmente infectados con *Perkinsus* se ha observado que el porcentaje de hemocitos en apoptosis disminuye del 50% al 10% (Sunila y LaBanca, 2003).

8.16 Aproximación transcriptomica de *C. corteziensis*

En este estudio se generó una aproximación transcriptomica de *C. corteziensis* con secuenciación masiva, contribuyendo al conocimiento genómico de la especie, y a la identificación de genes en respuesta ante patógenos en moluscos. A pesar de que están disponibles plataformas como 454 de Roche que generar lecturas de 700 pb, la cobertura es menor que la que generada por Illumina 2000. Esta tecnología se ha utilizado para secuenciar transcriptomas *de novo*, obteniendo una amplia cobertura que permite realizar expresión diferencial por un costo menor al de 454. La calidad de las secuencias de Illumina fueron muy buenas, en donde más del 90% tuvieron valores de al menos Q20, a diferencia de las lecturas que se obtienen en la mayoría de los secuenciadores 454 en donde la calidad es menor. El problema con la alta cantidad de información que se genera con los secuenciadores de Illumina, es que se requiere alta capacidad de equipo de cómputo para realizar el análisis informático.

A pesar de que Illumina proporcionó lecturas de 100 pb y que para el ensamblaje del transcriptoma de *C. corteziensis* realizado con CLC no se utilizó genoma de referencia, se obtuvieron contigs con una longitud N50 de 900 pb. Estudios con características de secuenciación similares como el de *Anopheles funestus*, en donde compararon varios ensambladores, encontraron que Velvet que realizó el mejor ensamble formó contigs de N50 de 1,140 (Crawford et al., 2010) lo cual está muy cercano a la longitud de los *contigs* que obtuvimos para *C. cortezienesis* con CLC. En algunos casos se ha obtenido que no solo el ensamblador es la limitante para realizar *contigs* largos, siendo el análisis de limpieza previo y los parámetros que se utilizan para ensamblar los que generan mejor ensambles. Tal es el caso del transcriptoma de la *Carthamus tinctorius* que a pesar de obtener 4.5 G que es del mismo orden de magnitud a lo obtenido para *C. corteziensis,* obtuvieron *contigs* con N50 de 290 pb (Lulin et al., 2012). Considerando que no todos los transcriptomas se pueden ensamblar igual, debido a que algunos tienen copias en tandem, secuencias con repeticiones, la cantidad de bases no es equilibrada, o que ciertos transcritos son muy abundantes y no permiten tener representado el transcriptoma. Los factores a considerar

para hacer un ensamblaje y decidir que ensamblador utilizar son: el número de K-meros, tipo de genoma complejo o simple, la profundidad de secuenciación, el tipo de secuenciación y si esta fue bidireccional (Zhao et al., 2011).

Para la construcción de *contigs* más largos para el transcriptoma de *C. corteziensis,* se considera necesario realizar un ensamblaje con otra herramienta como Trinity que se ha considerado como el mejor ensamblador para este tipo de estudios, sin embargo, requiere de altas cantidades de memoria y el ensamblaje es tardado (Zhao et al., 2011).

9 CONCLUSIONES

Mediante el análisis filogenético de las regiones ITS y NTS de *P. marinus* de *C. corteziensis* de Nayarit, se reconocieron dos clados filogenéticos, que pueden ser dos variantes. Ambas variantes fueron encontradas en ostiones de los dos esteros, indicando una distribución homogénea.

La alta similitud de *P. marinus* de Nayarit con los genotipos del Atlántico sugieren que el protozoario pudo ser introducido por movimientos de moluscos del Atlántico. Basado en los análisis del ITS, *P. marinus* de Nayarit presentó alta similitud con los genotipos de Maryland a Texas, excluyendo a los genotipos de Virginia.

La alta prevalencia aunada a la ausencia de mortalidades en los cultivos de *C. corteziensis*, son explicados por las diferencias en virulencia de *P. marinus*, el rápido crecimiento de *C. corteziensis* y la respuesta de defensa de *C. corteziensis* ante *P. marinus.*

El protozoario *P. marinus* fue encontrado en *C. corteziensis* de BCS, México, sin embargo, la intensidad de la infección fue baja (1–2). La alta identidad del ITS de *P. marinus* de Nayarit y de BCS, sugieren que el genotipo es el mismo en Nayarit y en BCS.

En condiciones experimentales se determinó que el incremento de la temperatura en *C. corteziensis* influye en la proliferación de *P. marinus,* y altas dosis del protozoario causan mortalidades que indican que *C. corteziensis* es susceptible a la infección por *P. marinus.*

Las diferencias entre las intensidades de infección entre ostiones inyectados con *P. marinus* en cohabitación, indican que hay una respuesta intraindividual ante la infección por *P. marinus*. Este primer screening con herramientas globales permitió identificar que la respuesta inmune es diferentes bajo diferentes niveles de infección por *P. marinus*.

Los genes de referencias con mayor estabilidad fueron: RPL10, GAPDH, RPL8, y el gen más inestable fue ACT–β.

Los mecanismos de respuesta inmune identificados para *C. corteziensis* con bajas infecciones fueron: Receptores Toll, factor nuclear NF–κβ, autofagia, apoptosis y estrés

oxidativo, y para ostiones con altas infecciones se identificaron genes de los procesos de inhibición de apoptosis y regulación negativa de apoptosis, y genes involucrados en la activación del factor nuclear NF–κβ. Genes involucrados en fagocitosis se presentaron en todas las condiciones de infección.

Ostiones con bajas infecciones de *P. marinus* presentaron mayores niveles de expresión relativa respecto a ostiones con altas infecciones del inhibidor de serine proteasas, *Duox* o NADPH–oxidasa y ACT–β involucrados en la fagocitosis, el antioxidante SOD y GST, LPTNF y ECSIT que participan en la traslocación del factor NF–κβ activando genes de respuesta inmune, caspasas CAS8, inhibidores de apoptosis B–IAP y B–IAP2 y el fragmentador de ADN que participan en la apotosis. Peroxidasin, caspasa 3 e NF–K–INH no presentaron diferencias entre condiciones de infección.

La baja infección en *C. corteziensis* infectado naturalmente con *P. marinus* de BCS se asoció con la resistencia generada por parte de distintos mecanismos del sistema inmune como fue el alto contenido de inhibidores de serine proteasas, alta producción de transcritos que participan en la producción de enzimas de estrés oxidativo y antioxidantes, así como la activación de la inflamación y muerte celular por apoptosis, considerando que el conjunto de los mecanismos de respuesta inmune permiten contrarrestar la proliferación de *P. marinus* en *C. corteziensis,* la cual no fue observada en ostiones con altas infecciones.

En este estudio se generó una aproximación transcriptomica de *C. corteziensis* en condiciones de infección por *P. marinus,* contribuyendo al conocimiento genómico de la especie.

10 LITERATURA CITADA

Abollo, E., S.M. Casas, G. Ceschia, A. Villalba. 2006. Differential diagnosis of *Perkinsus* species by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism assay. Mol. Cell Probes. 20 (6):323–9.

Aderem, A., R.J. Ulevitch. 2000. The innate immune response. Nature. 406:782–787.

Aguirre-Macedo, M.L., R.A. Simá-Alvarez, M.K. Román-Magaña, J.I. Güemez-Ricalde. 2007. Parasite survey of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in coastal lagoons of the southern Gulf of Mexico. J. Aquat. Anim. Health. 19 (4):270–9.

Akira, S., K. Takeda. 2004. Toll–like receptor signalling. Nat. Rev. Immunol. 4 (7):499–511.

Almeida, M., F. Berthe, A. Thebault, M.T. Dinis. 1999. Whole clam culture as a quantitative diagnostic procedure of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams *Ruditapes decussatus*. Aquaculture. 177 (1–4):325–332.

Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI–BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25 (17):3389–402.

Arzul, I., B. Chollet, J. Michel, M. Robert, C. Garcia, J.P. Joly, C. François, L. Miossec. 2012. One *Perkinsus* species may hide another: characterization of *Perkinsus* species present in clam production areas of France. Parasitology. 139 (13):1757–71.

Ashton-Alcox, K.A., Y. Kim, E.N. Powell. *Perkinsus marinus* assay. Haskin Shellfish Research Laboratory. Rutgers Univesity, NJ, USA.

Bachère, E., Y. Gueguen, M. González, J. Lorgeril, J. Garnier, B. Romestand. 2004. Insights into the anti–microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. Immunol. Rev. 198:149–68.

Barber, R.D., D.W. Harmer, R.A. Coleman, B.J. Clark. 2005. GAPDH as a housekeeping gene : analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. Physiol. Genomics. 21:389–395.

Brennand, A., M. Gualdrón-López, I. Coppens, D.J. Rigden, M.L. Ginger, P.A.M. Michels. 2011. Autophagy in parasitic protists: unique features and drug targets. Mol. Biochem. Parasitol. 177 (2):83–99.

Brothers, K.M., R.L. Gratacap, S.E. Barker, Z.R. Newman, A. Norum, R.T. Wheeler. 2013. NADPH Oxidase–Driven Phagocyte Recruitment Controls *Candida albicans* Filamentous Growth and Prevents Mortality. PLoS Pathog. 9 (10): e1003634.

Brown, G.D., K.L. Hudson, K.S. Reece. 2004. Multiple polymorphic sites at the ITS and

ATAN loci in cultured isolates of *Perkinsus marinus*. J. Eukaryot. Microbiol. 51 (3):312–20.

Buggé, D.M., H. Hégaret, G.H. Wikfors, B. Allam. 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. Fish Shellfish Immun. 23 (1):188–96.

Burreson, E., R. Sima-Alvarez, V. Vidal-Martinez, L. Aguirre-Macedo. 1994. *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) as a potential source of oyster *Crassostrea virginica* mortality in coastal lagoons of Tabasco, Mexico. Dis. Aquat. Org. 20:77–82.

Bushek, D., S. Allen. 1996. Host–parasite interactions among broadly distributed populations of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and the protozoan Perkinsus marinus. Mar. Ecol. Prog. Ser. 139:127–141.

CESANAY, 2010. Comité de Sanidad Aquicola de Nayarit. 2010. Available at: http://www.cesanay.com/.

Calvo, G.W., R.J. Fagan, K.N. Greenhawk, G.F. Smith, S.J. Jordan, S. J.. 1996. Spatial distribution and intensity of *Perkinsus marinus* infections in oyster recovery areas in Maryland. J. Shellfish Res. 15 (2):381–389.

Casas, S.M, J.F. La Peyre, K.S. Reece, C. Azevedo, A. Villalba. 2002. Continuous in vitro culture of the carpet shell clam *Tapes decussatus* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. Dis. Aquat. Org. 52 (3):217–31.

Chaney, M.L., A.Y. Gracey. 2011. Mass mortality in Pacific oysters is associated with a specific gene expression signature. Mol. Ecol. 20 (14):2942–54.

Chu, F.L.E., P. Soudant, E.D. Lund, 2003. *Perkinsus marinus*, a protozoan parasite of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*): effects of temperature on the uptake and metabolism of fluorescent lipid analogs and lipase activities. Exp. Parasitol. 105 (2):121–30.

Conesa, A., S. Götz. 2008. Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. Int. J. Plant Genomics. 2008:619832.

Crawford, J.E., W.M. Guelbeogo, A. Sanou, A. Traoré, K.D. Vernick, N. Sagnon, B.P. Lazzaro. 2010. De Novo Transcriptome Sequencing in *Anopheles funestus* Using Illumina RNA–Seq Technology. PLoS ONE. 5 (12): e14202.

Cáceres-Martínez, J, R. Vásquez-Yeomans, G. Padilla-Lardizábal, M.A. Del Río Portilla. 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *Crassostrea corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. J. Invertebr. Pathol. 99 (1):66–73.

Cáceres-Martínez, J., R. Vásquez-Yeomans, G. Padilla-Lardizábal. 2010. Parasites of the Pleasure Oyster *Crassostrea corteziensis* Cultured in Nayarit, Mexico. J. Aquat. Anim. Health. 22 (3):141–151.

De Santis, C., C. Smith-Keune, D.R. Jerry. 2011. Normalizing RT–qPCR data: are we getting the right answers? An appraisal of normalization approaches and internal reference genes from a case study in the finfish Lates calcarifer. Mar. Biotechnol. 13 (2):170–80.

Dheilly, N.M., C. Lelong, A. Huvet, P. Favrel. 2011. Development of a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) 31,918–feature microarray: Identification of reference genes and tissue–enriched expression patterns. BMC Genom. 12 (1): 468.

Dungan, C.F., R.M. Hamilton, K.L. Hudson, C.B. McCollough, K.S. Reece. 2002. Two epizootic diseases in Chesapeake Bay commercial clams, *Mya arenaria* and *Tagelus plebeius*. Dis. Aquat. Org. 50 (1):67–78.

Enríquez-Espinoza, T.L., J.M. Grijalva-Chon, R. Castro-Longoria, J. Ramos-Paredes. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. Dis. Aquat. Org. 89 (3):269–73.

Escobedo-Fregoso, C., I. Arzul, N. Carrasco, J.N. Gutiérrez-Rivera, R. Llera-Herrera, R. Vázquez-Juárez. 2013. Polymorphism at the ITS and NTS Loci of *Perkinsus marinus* Isolated from Cultivated Oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico and Phylogentic Relationship to *P. marinus* along the Atlantic Coast. Transbound. Emerg. Dis. DOI:10.1111/tbed.12090.

Ewing, B., L. Hillier, M.C. Wendl, P. Green. 1998. Base–Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred . I . Accuracy Assessment. Genome Res. 8:175–185.

Ewing, B., P. Green. 1998. Base–Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred . II . Error Probabilities. Genome Res. 8:186–194.

Faveri, J.D., R.M. Smolowitz, S.B. Roberts. 2009. Development and Validation of a Real–Time Quantitative PCR Assay for the Detection and Quantification of *Perkinsus marinus* in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. J. Shellfish Res. 28 (3):459–464.

Fleury, E., J. Moal, V. Boulo, J.Y. Daniel, D. Mazurais, A. Hénaut, C. Corporeau, P. Boudry, P. Favrel, A. Huvet. 2010. Microarray–based identification of gonad transcripts differentially expressed between lines of pacific oyster selected to be resistant or susceptible to summer mortality. Mar. Biotechnol. 12 (3):326–39.

Garreis, K.A., J.F. La Peyre, M. Faisal. 1996. The effects of *Perkinsus marinus* extracellular products and purified proteases on oyster defence parameters *in vitro*. Fish Shellfish Immun. 6 (8):581–597.

Gauthier, J.D., G.R. Vasta. 1995. In vitro culture of the eastern oyster parasite *Perkinsus marinus*: Optimization of the methodology. J. Invertebr. Pathol. 66 (2):156–168.

Gullian-Klanian, M., J.A. Herrera-Silveira, R. Rodríguez-Canul, L. Aguirre-Macedo. 2008.

Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. Dis. Aquat. Org. 79 (3):237–247.

Harvell, C.D., C.E. Mitchell, J.R. Ward, S. Altizer, A.P. Dobson, R.S. Ostfeld, M.D. Samuel. 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. Science. 296 (5576):2158–2162.

Haven, D.S., R. Morales-Alamo. 1970. Filtration of particles from suspension by the American oyster *Crassostrea virginica*. Biolo. Bull., 139 (2):248.

Hughes, F.M., B. Foster, S. Grewal, I.M. Sokolova. 2010. Apoptosis as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus marinus*. Fish Shellfish Immun. 29 (2):247–57.

Itoh, N., Q. Xue, Y. Li, R.K. Cooper, J.F. La Peyre. 2007. cDNA cloning and tissue expression of plasma lysozyme in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Fish Shellfish Immun. 23 (5):957–68.

Jiang, Z., H.J. Johnson, H. Nie, J. Qin, T.A. Bird, X. Li. 2003. Pellino 1 is required for interleukin–1 (IL–1)–mediated signaling through its interaction with the IL–1 receptor–associated kinase 4 (IRAK4)–IRAK–tumor necrosis factor receptor–associated factor 6 (TRAF6) complex. J. Biol. Chem. 278 (13):10952–6.

Jones, G., D. Jones, L. Zhou, H. Steller, Y. Chu. 2000. Deterin, a new inhibitor of apoptosis from *Drosophila melanogaster*. J. Biol. Chem. 275 (29):22157–22165.

Jordan, P.J., L.E. Deaton. 2005. Characterization of phenoloxidase from *Crassostrea virginica* hemocytes and the effect of *Perkinsus marinus* on phenoloxidase activity in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Geukensia demissa*. J. Shellfish Res. 24 (2):477–482.

Joseph, S.J., J.A. Fernández-Robledo, M.J. Gardner, N.M. El-Sayed, C.H. Kuo, E.J. Schott, H. Wang, J.C. Kissinger, G.R. Vasta. 2010. The Alveolate *Perkinsus marinus*: biological insights from EST gene discovery. BMC Genom. 11:11–21.

Jouaux, A., M. Lafont, J.L. Blin, M. Houssin, M. Mathieu, C. Lelong. 2013. Physiological change under OsHV–1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. BMC Genom. 14 (1): P590.

Kang, Y.S., Y.M. Kim, K.I. Park, C.S. Kim, K.S. Choi, M. Cho, M. 2006. Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. Dev. Comp. Immunol. 30 (12):1119–31.

Kumagai, T., Y. Osada, T. Kanazawa. 2006. 2–Cys peroxiredoxins from *Schistosoma japonicum*: the expression profile and localization in the life cycle. Mol. Biochem.

Parasitol. 149(2):135–149.

La Peyre, J.F., Q.G. Xue, N. Itoh, Y. Li, R.K. Cooper. 2010. Serine protease inhibitor cvSI–1 potential role in the eastern oyster host defense against the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. Dev. Comp. Immunol. 34 (1):84–92.

Librado, P., J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 25 (11):1451–2.

Llera-Herrera, R., A. García-Gasca, A. Huvet, A.M. Ibarra. 2012. Identification of a tubulin–α gene specifically expressed in testis and adductor muscle during stable reference gene selection in the hermaphrodite gonad of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. Mar. Genom. 6:33–44.

Lulin, H., Y. Xiao, S. Pei, T. Wen, H. Shangqin. 2012. The first Illumina–based de novo transcriptome sequencing and analysis of safflower flowers. PloS One. 7 (6): e38653.

Mackin, J.G.. 1947. Histopathology of Infection of *Crassostrea virginica* (Gmelin) by *Dermocystidium marinum*, Mackin, Owen, and Collier. Bull. Mar. Sci. 1 (1):72–87.

Mansilla Pareja, M.E., M.I. Colombo. 2013. Autophagic clearance of bacterial pathogens: molecular recognition of intracellular microorganisms. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3 (54):1–14.

Marcos-López, M., P. Gale, B.C. Oidtmann, E.J. Peeler. 2010. Assessing the impact of climate change on disease emergence in freshwater fish in the United Kingdom. Transbound. Emerg. Dis. 57 (5):293–304.

Marsh, A G, J.D. Gauthier, G.R. Vasta. 1995. A semiquantitative PCR assay for assessing *Perkinsus marinus* infections in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. J. Parasitol. 81 (4):577–83.

May, R.C., L.M. Machesky. 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. J. Cell Sci. 114:1061–77.

Montes, J.F., M. Durfort, J. García-Valero. 1995. Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. Cell, Tissue Res. 279 (3):529–538.

Moore, M.N., J.I. Allen, P.J. Somerfield. 2006. Autophagy: role in surviving environmental stress. Mar. Environ. Res. 62:S420–S425.

Morga, B., I. Arzul, N. Faury, T. Renault. 2010. Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR. Fish Shellfish Immun. 29 (6):937–45.

Moss, J.A., J. Xiao, C.F. Dungan, K.S. Reece. 2008. Description of *Perkinsus beihaiensis*,

a new *Perkinsus* sp. Parasite in Oysters of Southern China. J. Eukaryot. Microbiol. 55 (2):117–130.

Nappier, S.P., T.K. Graczyk, K.J. Schwab. 2008. Bioaccumulation, retention, and depuration of enteric viruses by *Crassostrea virginica* and *Crassostrea ariakensis* oysters. App. Environ. Microbiol. 74 (22):6825–31.

Nelson, R. E., L.I. Fessler, Y. Takagi, B. Blumberg, D.R. Keene, P.F. Olson, C.G. Parker, J.H. Fessler. 1994. Peroxidasin: a novel enzyme–matrix protein of *Drosophila* development. EMBO J. 13 (15):3438–3447.

OIE, 2012. World Organisation for Animal Health. Available at: http://www.oie.int/.

Oidtmann, B., C. Johnston, K. Klotins, G. Mylrea, P.T. Van, S. Cabot, P.R. Martin, L. Ababouch, F. Berthe. 2013. Assessment of the Safety of Aquatic Animal Commodities for International Trade: The OIE Aquatic Animal Health Code. Transbound. Emerg. Dis. 60 (1):27–38.

Oliver, L. M., W.S. Fisher, S.E. Ford, L.M. Calvo, E.M. Burreson, E.B. Sutton, J. Gandy. 1998. *Perkinsus marinus* tissue distribution and seasonal variation in oysters *Crassostrea virginica* from Florida, Virginia and New York. Dis. Aquat. Org. 34 (1):51–61.

Ottaviani, E., A. Franchini, D. Malagoli, S. Genedani. 2000. Immunomodulation by recombinant human interleukin–8 and its signal transduction pathways in invertebrate hemocytes. Cell. Mol. Life Sci. 57 (3):506–13.

Park, K.I., H.S. Yang, H.S. Kang, M. Cho, K.J. Park, K.S. Choi. 2010. Isolation and identification of *Perkinsus olseni* from feces and marine sediment using immunological and molecular techniques. J. Invertebr. Pathol. 105 (3):261–9.

Park, K.I., J.K. Park, J. Lee, K.S. Choi. 2005. Use of molecular markers for species identification of Korean *Perkinsus* sp. isolated from Manila clams *Ruditapes philippinarum*. Dis. Aquat. Org. 66 (3):255–63.

Park, K.I., T.T.T. Ngo, S.D. Choi, M. Cho, K.S. Choi. 2006. Occurrence of *Perkinsus olseni* in the Venus clam *Protothaca jedoensis* in Korean waters. J. Invertebr. Pathol. 93 (2):81–7.

Park, K.I., K.S. Choi. 2001. Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. Aquaculture. 203 (1–2):9–22.

Prado-Alvarez, M., C. Gestal, B. Novoa, A. Figueras. 2009. Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni*. Fish Shellfish Immun. 26 (1):72–83.

Péan, C.B., M.S. Dionne. 2014. Intracellular infections in *Drosophila melanogaster*: Host defense and mechanisms of pathogenesis. Dev. Comp. Immunol. 42(1):57–66.

Quick, J.A.. 1972. Fluid Thioglycollate Medium Assay of *Labyrinthomyxa* Parasites in Oysters, Fla. Dep. Nat. Resour. Mar. Lab. 4 (4):1–12.

Ragone Calvo, L.M., C.F. Dungan, B.S. Roberson, E.M. Burreson. 2003. Systematic evaluation of factors controlling *Perkinsus marinus* transmission dynamics in lower Chesapeake Bay. Dis. Aquat. Org. 56 (1):75–86.

Ray, S.M. 1963. A review of the culture method of detecting *Dermocystidium marinus* with suggested modifications and precautions. Proc. Nat. Shellfish. Assoc. 54:55–69.

Reece, K., C. Dungan, E. Burreson. 2008. Molecular epizootiology of *Perkinsus marinus* and *P. chesapeaki* infections among wild oysters and clams in Chesapeake Bay, USA. Dis. Aquat. Org. 82:237–248.

Reece, K.S., D. Bushek, K.L. Hudson, J.E. Graves. 2001. Geographic distribution of *Perkinsus marinus* genetic strains along the Atlantic and Gulf coasts of the USA. Mar. Biol. 139 (6):1047–1055.

Robledo, J.A.F., A.C. Wright, A.G. Marsh, G.R. Vasta. 1999. Nucleotide sequence variability in the nontranscribed spacer of the rRNA locus in the oyster parasite *Perkinsus marinus*. J. Parasitol. 85:650–656.

Rodríguez-Jaramillo, C., M.A. Hurtado-Oliva, E. Romero-Vivas, J.L. Ramírez, M. Manzano, E. Palacios. 2008. Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. J. Shellfish Res. 27 (5): 81–87.

Romestand, B., F. Corbier, P. Roch. 2002. Protease inhibitors and haemagglutinins associated with resistance to the protozoan parasite, *Perkinsus marinus*, in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Parasitol. 125 (Pt 4):323–329.

Samain, J.M., H. McCombie. 2008. Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas:* The Morest Project. Quae, ed., Versailles. 379.

Schroeder, A., O. Mueller, S. Stocker, R. Salowsky, M. Leiber, M. Gassmann, S. Lightfoot, W. Menzel, M. Granzow, T. Ragg. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Mol. Biol. 7 (3):1–14.

Sokolova, I. 2009. Apoptosis in molluscan immune defence. Invertebrate Surviv. J. 6:49–58.

Sunila, I, R.M. Hamilton, C.F. Dungan. 2001. Ultrastructural characteristics of the in vitro cell cycle of the protozoan pathogen of oysters, *Perkinsus marinus*. J

Eukaryot. Microbiol. 48 (3):348–61.

Sunila, I., J. LaBanca. 2003. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Dis. Aquat. Org. 56 (2):163–70.

Syed, N.H., M. Kalyna, Y. Marquez, A. Barta, J.W.S. Brown. 2012. Alternative splicing in plants–coming of age. Trends Plant Sci. 17 (10):616–23.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol., 28 (10):2731–2739.

Tanguy, A., X. Guo, S.E. Ford. 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. Gene. 338 (1):121–131.

Thompson, P.C., B.M. Rosenthal, M.P. Hare. 2011. An evolutionary legacy of sex and clonal reproduction in the protistan oyster parasite *Perkinsus marinus*. Infect. Genet. Evol. 11 (3):598–609.

Tricarico, C., P. Pinzani, S. Bianchi, M. Paglierani, V. Distante, M. Pazzagli, S.A. Bustin, C. Orlando. 2002. Quantitative real–time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. Anal. Biochem. 309 (2):293–300.

van der Wel, N., D. Hava, D. Houben, D. Fluitsma, M. van Zon, J. Pierson, M. Brenner, P.J. Peters. 2007. M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. Cell. 129 (7):1287–98.

Villalba, A., Reece, K.S., Ordás, M.C., Casas, S.M., Figueras, A., 2004. Perkinsosis in molluscs: a review. Aquat. Living Resour. 17 (4):411–432.

Villalba, A., S.M. Casas, C. López, M.J. Carballal. 2005. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. Dis. Aquat. Org. 65 (3):257–67.

Wang, C. 1998. NF–B Antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c–IAP1 and c–IAP2 to Suppress Caspase–8 Activation. Science. 281 (5383):1680–1683.

Ward, J.E., R.I.E. Newell, R.J. Thompson, B.A. MacDonald. 1994. In vivo Studies of Suspension–Feeding Processes in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). Biol. Bull. 186 (2), P. 221.

Ward, J.R., K.D. Lafferty. 2004. The elusive baseline of marine disease: are diseases in ocean ecosystems increasing?. PLoS biology 2 (4):E120.

Winnebeck, E.C., C.D. Millar, G.R. Warman. 2010. Why does insect RNA look degraded?

J. Insect Sci. 10 (159):1–7.

Xue, Q., G. Waldrop, K. Schey, N. Ithon, M. Ogawa, R. Cooper, J. Losso, J.F. La Peyre. 2006. A novel slow–tight binding serine protease inhibitor from eastern oyster (*Crassostrea virginica*) plasma inhibits perkinsin, the major extracellular protease of the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 145 (1):16–26.

Yang, H.S., K.J. Park, K.S. Choi. 2010. Pathologic survey on the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve 1850) from Haeju off the western coastal Yellow Sea. Ocean Sci. J. 45 (2):93–100.

Zhang, L., L. Li, G. Zhang. 2011a. A *Crassostrea gigas* Toll–like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. Fish Shellfish Immun. 30 (2):653–60.

Zhang, L., L. Li, G. Zhang. 2011b. Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. Dev. Comp. Immunol. 35 (5):603–10.

Zhang, L., L. Li, G. Zhang. 2012. The first identification of molluscan Ecsit in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, and its expression against bacterial challenge. Aquaculture Res. 43 (8):1071–1080.

Zhang, Y., X. He, Z. Yu. 2011. Two homologues of inhibitor of NF–kappa B (IκB) are involved in the immune defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Fish Shellfish Immun. 30 (6):1354–61.

Zhao, Q. Y., Y. Wang, Y.M. Kong, D. Luo, X. Li, P. Hao. 2011. Optimizing *de novo* transcriptome assembly from short–read RNA–Seq data: a comparative study. BMC Bioinf. 12 Suppl 1 (Suppl 14):1–12.

ANEXO I

Propagación de *Perkinsus marinus* en medio DME–Ham´s F12 (1:2)

1. Preparación de soluciones.

1.1 Agua de mar con Hepes y bicarbonato de sodio (1L).

- Disolver 35 g de sales marinas en 1L de agua destilada.
- Adicionar 50 mM de Hepes (13.915 g/l)
- Adicionar 3.5 mM de Bicarbonato de sodio (0.294 g/l)
- Filtrar la solución a través de 0.45 µm y autoclavear durante 15 min.

En 1L de agua de mar estéril con Hepes (50 mM) y Bicarbonato de sodio (3.5 mM):

- Disolver medio frasco de DME (5 g) y un frasco de Ham´s F'12 (10 g) para tener una solución a un radio de 1:2 (DME–F'12). (Almacenado en 4°C).
- Adicionar 5% de Suero fetal de bovino (calentarlo antes de usar para activarlo, Almacenado en –20°C)
- Ajustar el pH entre 6.8 y 6.8 (Solución de color entre rojo y rosa)
- Filtrar a través de 0.2 µm (No autoclavear).
- Adicionar 100 U/ml de Penicilina G y 100 U/ml de Estreptomicina (estan mezcladas la penicilina y estreptomicina a 5,000 U/ml, almacenadas a –20 °C)
- 50 U/ml Nistatina (stock diluido en agua de mar estéril con 1,260,000 U/ml a -20 °C)

1.2 Preparación de DME-F12 para los recambios semanales.

Preparación de 50 ml de medio DME-F'12.

- Adicionar 46.5 ml de DME-F'12 preparado como se menciona arriba.
- 2 µl del stock de nistatina (equivalente a 50 U/ml)
- 2.5 ml de suero fetal de bovino (equivalente al 5%)
- 1 ml de penicilina y estreptomicina (equivalente a 100 U/ml)

1.3 Preparación de stock de antibioticos (preparar 50 ml) para los siguientes lavados.

- Adicionar 100 U/ml de Penicilina G y 100 U/ml de Estreptomicina (estan mezcladas la penicilina y estreptomicina a 5,000 U/ml, almacenadas a -20 °C)
- 50 U/ml Nistatina (stock diluido en agua de mar estéril con 1,260,000 U/ml a -20 °C)

2. Cultivo de *P. marinus* a partir de branquias de ostión *C. corteziensis*

1. Adicionar 2 ml de agua de mar estéril en placas para cultivo de tejidos de 24 pozos.
2. Secar un trozo de las branquias en papel absorbente.
3. Pasar dos veces los tejidos por el agua de mar en las placas de 24 pozos.
4. Adicionar 2 ml del stock de antibioticos a una placa adicional para cultivo de tejidos.
5. Colocar los tejidos en el antibiótico durante 30 minutos.
6. Lavar los tejidos en agua de mar.
7. Colocar los tejidos en el antibiótico durante 30 minutos.
8. Lavar los tejidos en agua de mar.
9. En tubos eppendorf, adicionar 250 µl de la solución de antibiótico.
10. Colocar el tejido en cada tubo con el antibiótico.
11. Con pistilo estéril macerar el tejido (sin homogenizador automático)
12. Adicionar 750 µl de antibiótico durante 15 min.
13. Centrifugar a 12,000 g durante 5 min.
14. Eliminar el sobrenadante y adicionar 1 ml de agua de mar filtrada.
15. Suspender y deshacer manualmente el pellet.
16. Filtrar a través de una malla (poner maya, embudo y tubo eppendorf)
17. Desechar lo retenido en la malla.
18. Poner 1 ml de medio DME-F'12-antibioticos en cada pozo.
19. Adicionar 50 µl del filtrado en cada pozo (con 4 replicas)
20. Tapar las placas e incubar a 26-28ºC en cámara húmeda.
21. Observar y contar el crecimiento en microscopio invertido cada 3 días, cuando el crecimiento es elevado; adicionar 20 µl en un portaobjetos y observarlo en microscopio a 40X.

22. En caso de que el crecimiento sea elevado, hacer diluciones y contar en cámara de Neubauer semanalmente.

3. Mantenimiento del cultivo

1. Cada 6-8 días retirar la mitad del medio de cada placa y reemplazarlo para enriquecerlo.
2. En caso de que el crecimiento sea muy elevado centrifugar a 800 g por 15 min, descartar el sobrenadarnte y sembrarlo nuevamente en medio DME'F12 con antibióticos e incubarlo nuevamente.
3. En caso de contaminación, hacer lavados con 750 µl de la solución de antibióticos (penicilina, estreptomicina, nistatina).
4. Cuando se llegue a 10^4 hipnoesporas aprox. Centrifugar el contenido a 800 g durante 15 min, Si es necesario enjuagar con antibióticos.
5. Resuspender el pellet con 1 ml de medio de cultivo.
6. Adicionarlo a frascos con 4 ml de cultivo e incubarlos con las mismas condiciones.
7. Hacer conteos cada 3 días. Y seguir con el cultivo hasta obtener una densidad de 10^6 cel/ml

ANEXO II

Publicaciones