

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA, BAJA CALIFORNIA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ACUICULTURA**

Estudio epizootiológico de *Candidatus Xenohaliotis californiensis* (Prokaryota) en abulón azul (*Haliotis fulgens*) y amarillo (*H. corrugata*) de la península de Baja California

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Montserrat Muñoz Flores

Ensenada, Baja California, México
2014

Tesis defendida por
Montserrat Muñoz Flores

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Director del Comité

Dra. Rebeca Vásquez Yeomans
Miembro del Comité

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Miembro del Comité

Dr. Josué Álvarez Borrego
Miembro del Comité

Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Coordinador
del Posgrado en Ciencias en Acuicultura

Dr. Jesús Favela Vara
Director de Estudios de Posgrado

Septiembre, 2014

Resumen de la tesis que presenta **Montserrat Muñoz Flores**, como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Estudio epizootiológico de *Candidatus Xenohalotus californiensis* (Prokaryota) en abulón azul (*Haliotis fulgens*) y amarillo (*H. corrugata*) de la península de Baja California.

Resumen elaborado por:

M.V.Z Montserrat Muñoz Flores

El abulón es un recurso pesquero, de gran importancia socio-económica, que se distribuye a lo largo de las costas de California, Estados Unidos de América (EUA) y de la Península de Baja California, México. La tendencia histórica en la captura de este recurso refleja una disminución significativa asociada a sobrepesca, pesca ilegal y mortalidades masivas relacionadas con eventos como el fenómeno de El Niño, hipoxia generada por surgencias, acidificación por el cambio climático, destrucción de hábitats y presencia de enfermedades. A la enfermedad del Síndrome de Deshidratación (SD), provocada por la bacteria intracelular *Candidatus Xenohalotus californiensis* del orden Rickettsiales, se le ha atribuido la devastación de las poblaciones de abulón negro (*Haliotis cracherodii*), rojo (*H. rufescens*) y amarillo (*H. corrugata*) en California, EUA.

Mientras que, en México se ha detectado la presencia de este patógeno en abulón negro, rojo, amarillo y azul (*H. fulgens*) desde los años noventa. Sin embargo, se desconocen aspectos como la distribución de esta procariota y el desarrollo de la enfermedad del SD en estas especies. Por otra parte, aunque está documentada la descripción del daño tisular asociado al SD para poblaciones de abulón negro y rojo de California, en abulón azul y amarillo de Baja California no existen estudios al respecto.

Por ello, con objeto de determinar la prevalencia, intensidad y distribución de *Candidatus X. Californiensis* por especie y sexo; así como describir la morfología de túbulos y divertículos digestivos y el daño tisular asociado, se analizaron un total de 378 abulones de talla comercial (199 azules y 179 amarillos) provenientes de capturas comerciales de las temporadas de Abril/2012, Noviembre/2012 y Mayo/2013.

La presencia de *Candidatus X. californiensis* se determinó por histología y su identidad se confirmó mediante la técnica de PCR. La intensidad se estimó considerando el número de inclusiones de *Candidatus X. californiensis* y el daño tisular asociado a ellas, estableciéndose tres grados de intensidad (leve, media y severa). La prevalencia fue de $87\% \pm 14$ y $59\% \pm 10$ en abulón azul y amarillo, respectivamente. La prevalencia promedio por sexos en el abulón azul fue $77\% \pm 17$ en machos, $89\% \pm 15$ en hembras y $83\% \pm 29$ en

abulones indiferenciados. En el caso de abulón amarillo fue de $58\% \pm 6$ en machos, $58\% \pm 6$ en hembras y $70\% \pm 28$ en indiferenciados. En general, la intensidad de *Candidatus X. californiensis* fue de leve a media en machos y hembras. Mientras que, las intensidades severas observadas estuvieron asociadas a hembras y organismos indiferenciados. La presencia de la procarionta en altos porcentajes en las poblaciones estudiadas sugiere endemismo. Por otro lado, el desarrollo de los túbulos y divertículos digestivos en abulones sanos, fue similar a la descrita para otros moluscos y crustáceos. En abulones con intensidad leve, se observó una compresión del núcleo de la célula hospedera e hipertrofia de la misma, sin pérdida de la arquitectura normal de los tejidos. En abulones con intensidad media se observaron células hipertrofiadas distribuidas focalmente resultando en la deformación del tejido, hiperplasia, displasia y en algunos casos desprendimiento celular. Mientras que, en abulones con intensidad severa se observaron y pérdida de la arquitectura normal en la mayor parte del tejido; hay hiperplasias, displasias, sustitución de los divertículos por tejido de tipo fibroso, y en algunos casos metaplasias. Este tipo de alteraciones tisulares son acordes a la evolución de una enfermedad crónica. No se observó correspondencia de la intensidad de la infección con los signos externos descritos para el SD reportados en diversas especies de abulón de Estados Unidos. Se recomienda realizar evaluaciones continuas de la presencia de *Candidatus X. Californiensis* en la Península de Baja California, con el objeto de conocer mejor la epizootiología de la enfermedad del SD y dimensionar su efecto sobre las poblaciones silvestres de diversas especies de abulones. Así mismo, se recomienda realizar un estudio a nivel de laboratorio que permita definir con mayor claridad la patogénesis de la enfermedad y su relación con la apariencia externa de los abulones enfermos.

Palabras clave: ***Xenohaliotis californiensis*, rickettsia, prevalencia, intensidad, lesiones, displasia, fibrosis.**

Abstract of the thesis presented by Montserrat Muñoz Flores as a partial requirement to obtain the Master in Science degree in Aquaculture

Epizootic study of *Candidatus Xenohaliotis californiensis* (Prokaryote) in Blue abalone (*Haliotis fulgens*) and Yellow abalone (*Haliotis corrugata*) from the peninsula of Baja California

Abstract by:

M.V.Z. Montserrat Muñoz Flores

Abstract

Abalone is a fishing resource of great social-economic importance, that is distributed along the coasts of California, United States of America (USA) and the peninsula of Baja California, México. The historical capture tendency of this resource reflects a significant decline associated with overfishing, illegal poaching and mass mortalities related with events such as El Niño southern oscillation, hypoxia generated by upwelling, acidification due to climate change, habitat destruction and the presence of diseases. Withering syndrome (WS) disease, is caused by the intracellular bacteria *Candidatus Xenohaliotis californiensis* of the order Rickettsiales, this disease is held responsible for the devastation of black abalone (*Haliotis cracherodii*), red abalone (*Haliotis rufescens*) and yellow abalone (*Haliotis corrugata*) populations in California, USA.

In Mexico, the presence of this pathogen has been detected in black, red, yellow and blue abalone (*Haliotis fulgens*) since the 90's. However, aspects such as the distribution of this prokaryote and disease development in the mentioned species are unknown. Furthermore, the description of tissular damage associated with WS in black and red abalone from California has been documented however, in blue and yellow abalone from Baja California no studies have been conducted on these aspects.

Thus, with the objective of determining the prevalence, intensity and distribution of *Candidatus X. californiensis* by specie and sex, as well as to describe the morphology of tube and digestive diverticula and the damage associated with these tissues, 378 abalone of legal size (199 blue abalone and 179 yellow abalone) from commercial captures of April /2012, November/2012 and May/2013 were analyzed.

The presence of *Candidatus X. californiensis* was determined by histology and the identity was confirmed by PCR technique. The intensity was estimated considering the number of inclusions of *Candidatus X. californiensis* and tissue damage associated with inclusions, establishing three degrees of intensity (light, medium and sever). The prevalence was $87\% \pm 14$ and 59 ± 10 in blue and yellow abalone respectively. The average prevalence by sex in blue abalone was 77 ± 17 in males, 89 ± 15 in females and 83 ± 29 in undifferentiated abalone. In the case of yellow abalone the average prevalence was 58 ± 6 in males, 58 ± 6 in females and 70 ± 28 in undifferentiated abalone. In general, the intensity of *Candidatus X. californiensis* went from light to medium in male and females. While sever intensities were associated with females and undifferentiated organisms. The presence of the prokaryote in high percentages in the studied populations suggests endemism. Furthermore, the development of tubes and digestive diverticula in healthy abalone, was similar to that described in other mollusk and crustacean. In abalone with low intensity, a compression of the host nucleus and

hypertrophy of the host cell, without the loss or the normal architecture of tissues was observed. In abalone with medium intensities hypertrophied cell were observed distributed focally resulting in the distortion of tissue, hyperplasia, dysplasia and in some cases cellular detachment. Whereas in, abalone with sever intensity the loss of normal architecture was observed in the majority of the tissue, with hyperplasia, dysplasia, substitution of digestive diverticula with fibrous tissue, and in some cases metaplasia. These types of tissular alterations are consistent with the evolution of a chronic disease. No correspondence was observed between intensity of infection and the external signs described for WS of different species of abalone from USA. Continuous evaluations for the presence of *Candidatus X. californiensis* are recommended in the peninsula of Baja California, with the objective of obtaining a better understanding of the epizootiology of WS disease and dimensioning the effect of WS on wild abalone populations of different species. Likewise, a study at laboratory level is recommended to clarify and define the pathogenesis of the disease and its relationship with the external appearance of sick abalone

Palabras clave: ***Xenohalotis californiensis*, rickettsia, prevalencia, intensidad, lesiones, displasia, fibrosis.**

Dedicatorias

*Para mi inspiración y compañeros de aventuras;
Alejandra, Tomás, Luis, Ángeles y mi bebe Jordán.*

Agradecimientos

Gracias;

ACONACyT por otorgarme la beca de maestría, así como la beca mixta con la que realicé una estancia en el extranjero.

Al Dr. Jorge Cáceres Martínez, por su enorme paciencia, apoyo, por fondos económicos que destinó para cubrir gastos de mi estancia en USA, así como por su confianza y ánimo. Usted ha sido un gran maestro.

A la Dra. Rebeca Vásquez Yeomans por capacitarme en la técnica de PCR, apoyo y paciencia.

A la Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz por sus comentarios y sus enseñanzas.

Al Dr. Josué Álvarez Borrego por sus comentarios.

A las cooperativas La Purísima, Buzos y Pescadores, Bahía Tortugas, Emancipación, California de San Ignacio, Progreso y Punta Abreojos, por proporcionar los animales para este estudio.

A la M. en C. Yanet Guerreo Rentería, técnico del Laboratorio de Biología y Patología de Organismo Acuáticos del Departamento de Acuicultura del CICESE, por su apoyo y capacitación en los cortes histológicos. Así como su asesoría, paciencia y amistad. Siempre estarás en mi corazón, mi ángel.

La M. en C. Ananda Araceli Navarro Barrera por capacitarme en la toma de muestras en el abulón.

Amparo Valverde y Cecilia Loera.

A la M. en C. Gissel Tinoco Orta por su ayuda con los cortes histológicos.

A las secretarias Amparo y Cecilia por su apoyo en los trámites académicos.

A la secretaria Bibiana Medina Sánchez, por su apoyo en los trámites académicos, así como su especial apoyo en los trámites para la estancia en el extranjero.

A los profesores del Departamento de Acuicultura.

A la coordinadora del Departamento Dra. Beatriz Cordero por su paciencia y apoyo académico.

Al Dr. James D. Moore y a su equipo, por recibirme en su laboratorio y enseñarme sus técnicas de laboratorio.

Al Dr. Oscar Sosa Nishizaki y a su esposa, por el apoyo en la traducción de un artículo en japonés.

Al M. en C Roberto Cruz Flores, por su apoyo académico y en la revisión del abstrac.

A la Dra. Fabiola Peña, por sus comentarios y amistad.

A mi mapache, Fabiola Salcedo Morán por asesorarme en los trámites de la beca mixta, amistad incondicional y por darme ánimos. La vida nos da regalos y tú fuiste una bendición en mi vida.

Recordar es fácil para el que tiene memoria. Olvidar es difícil para el que tiene corazón.

Gabriel García Márquez

A todos, mil gracias.

Contenido

	Página
Resumen español.....	lii
Resumen ingles.....	V
Dedicatorias.....	vii
Agradecimientos.....	viii
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tablas.....	Xvi
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Haliótidis	1
1.2 Sistema digestivo de abulón	2
1.3 Pesquería del abulón	4
1.4 Mortalidades de abulón asociadas a agentes patógenos.....	8
1.5 <i>Candidatus Xenohalotis californiensis</i>	9
1.6 Daños a nivel tisular atribuidos a <i>Candidatus Xenohalotis californiensis</i>	10
1.7 Disminución de abulón en México y su relación con el síndrome de deshidratación.....	11
Capítulo 2. Justificación	13
2.1 Justificación.....	13
Capítulo 3. Hipótesis y objetivo.....	14
3.1 Hipótesis.....	14
3.2 Objetivo general.....	14
3.3 Objetivos particulares.....	15
	16
Capítulo 4. Materiales y métodos.....	16
4.1 Obtención de muestras.....	17
4.2 Análisis en fresco y preservación de las muestras.....	18
4.3 Análisis por histología	19
4.4 Prevalencia y grados de intensidad.....	20
4.5 Confirmación de la identidad del parásito mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.....	20
Capítulo 5. Resultados.....	23
5.1 Distribución y prevalencia de <i>X. californiensis</i> , por especie y sexo.....	23
5.2 Grados de intensidad por especie, temporada de captura y sexo.....	27
5.3 Resultados de PCR y secuenciación.....	30
5.4 Morfología normal observada y Descripción de lesiones.....	31
5.5 Alteraciones celulares y tisulares en la glándula digestiva.....	33
5.5.1 Grado 1, intensidad leve.....	34

Contenido (continuación)

	Página
5.5.2 Grado 2, intensidad media.....	34
5.5.3 Grado 3, intensidad severa.....	35
Capítulo 6. Discusión.....	40
6.1 Discusión.....	40
Capítulo 7. Conclusión.....	46
7.1 Conclusión.....	46
7.2 Recomendaciones.....	48
Referencias bibliográficas.....	49
Anexos.....	55

Lista de figuras

Figura		Página
1	Anatomía del abulón. A, víscera de abulón conservada en el laboratorio de patología de organismos acuáticos resultado de esta tesis .B y C abulón preparado mediante la técnica de resina por Yamamoto, K., Handa, T y Kondo, M. (2005).....	4
2	Delimitación de zonas establecida por la autoridad pesquera Nacional para el otorgamiento de permisos de captura de abulón. También se señala la ubicación de las cooperativas pesqueras en la península de Baja California, México. (Instituto Nacional de Pesca, 2006).....	56
3	Composición de la captura de abulón azul y amarillo expresada en porcentaje. Fuente: Carta Nacional de Pesca, (2000, 2004, 2010, 2012).....	7
4	Serie histórica de la captura de abulón. Fuente: Anuarios de CONAPESCA (1980-2012), Cariño y Montefore (2008).....	7
5	Zona de muestreo de para <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> . Las cooperativas marcadas con azul, fueron las que participaron en el muestreo.....	17
6	Ubicación de los cortes en el tejido blando para la realización del análisis histológico.....	19
7	Prevalencia de <i>Candidatus Xenohalictis californiensis</i> en <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> . En noviembre de 2012. **No incluye las cooperativas Bahía tortugas y California de San Ignacio escaso número de muestras.....	23
8	Prevalencia de <i>Candidatus Xenohalictis californiensis</i> por sexo en <i>H. fulgens</i> , durante los meses de muestreo.....	25
9	Prevalencia de <i>Candidatus Xenohalictis californiensis</i> , por sexo en <i>H. corrugata</i> , durante los meses de muestreo.....	26
10	Prevalencia de <i>Candidatus Xenohalictis californiensis</i> por sexo en <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> observada en la zona de captura durante el periodo de estudio 2012-2013.....	27
11	Intensidad de infección por especie (<i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> .) G1, grado 1, G2, grado 2, G3, grado 3.....	28

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
12	Intensidad de infección por sexo en <i>H. fulgens</i> . G1, grado 1, G2, grado 2, G3, grado 3.....	29
13	Intensidad de infección por sexo en <i>H. corrugata</i> . G1, grado 1, G2, grado 2, G3.....	30
14	Detección de un fragmento de 160 pb para <i>Candidatus Xenohaliotis californiensis</i> en <i>Haliotis fulgens</i> y <i>H. corrugata</i> . M, marcador molecular (1kb), P, control positivo, 1-3 <i>H. fulgens</i> , 4 y 5 <i>H. corrugata</i> , N, control negativo. Flecha, indica 160 pb.....	30
15	Estructura normal de glándula digestiva de abulón .A) Divertículo en etapa joven hacia el extremo superior derecho se observa un grupo de células beta (Cb) y a sus extremos células alfa (Ca) que, en conjunto, forman el divertículo. Hacia el centro se observa un pequeño lumen (L), así mismo se aprecian gránulos enzimáticos en color café (flechas). B) Cuatro grupos de células beta en forma de abanico cerrado a cuyos lados se desarrollarán células alfa, características de un divertículo joven. C) Divertículo en crecimiento. Izquierda en color morado las células beta, hacia la derecha se observan las células alfa, con varias vacuolas en su interior .D) Divertículos maduros fusionados, como resultado de la fusión se aprecia un aumento en el lumen (flecha).E) Estructura poligonal característica de la glándula digestiva, formada por divertículos digestivos. F) Células seroides (Cs), localizadas entre divertículos digestivos.	32
16	Esquema de cambios observados en los divertículos digestivos en organismos sin la presencia de la bacteria. Dj, divertículo joven. Dc, divertículo en crecimiento. Dm, divertículo maduro. B, célula críptica. D, células del ducto. A, gránulos enzimáticos. N, núcleo. L, lámina basal. d, células beta. C, células alfa con gránulos.....	33

Lista de figuras (continuación)

Figura		Página
17	Epitelio digestivo de abulón. A) Epitelio digestivo sano, en la base del epitelio los núcleos que tiñen basófilos y hacia la parte distal se observan los cilios, el epitelio es uniforme (recuadro), (Eb) epitelio basal. (Ed) epitelio digestivo. B) Epitelio digestivo, con infección leve, las inclusiones no causan cambios, C) Epitelio con infección media, hacia la parte distal de las células se observan las inclusiones de <i>Candidatus Xenohaliotis californiensis</i> que causan compresión entre células (recuadro). En el epitelio se observan diferentes grados de hiperplasia (Hp) E) Epitelio con infección severa, la presencia de inclusiones causa hipertrofia e hiperplasia total de epitelio. F) Epitelio con infección severa, la superficie está cubierta por displasias.....	37
18	Glándula digestiva de abulón. A) Glándula digestiva en organismo sano, los divertículos digestivos presentan células beta (Cb) y alfa (Ca) características y la apariencia general es saludable. B) Glándula digestiva con infección leve, se observa una lesión focal, al centro divertículo digestivo con hiperplasia (Hp) parcial del epitelio. Al rededor los divertículos conservan su apariencia normal. C) Glándula digestiva con infección media, el divertículo digestivo se observa con hiperplasia y displasia (Ds). D) Glándula digestiva con infección media. En el centro se muestra un divertículo digestivo con hipertrofia (Ht), hiperplasia, displasia y ruptura del epitelio (flecha). E) Glándula digestiva con infección severa, en el centro divertículo con displasia, rodeándolo tejido conectivo (Tc) y ocupando el lugar de los divertículos. Algunas inclusiones en el epitelio se señalan con flechas F) Glándula digestiva con infección severa, la forma típica de los divertículos se pierde. El epitelio pierde la estructura rectangular, las células epiteliales de los divertículos se transforman de cilíndricos a cuboidales lo que se denomina metaplasia (Mt) (recuadro) y el tejido conectivo invade la zona afectada, los divertículos digestivos jóvenes pierden su carga enzimática (Dj).....	38

Lista de figuras (continuación)

Figura	Página
19 Zonas de transición de divertículo digestivo a túbulo, de la glándula digestiva. A) Transición en organismo sin infección, la zona de transición es señalada por flechas. B) Transición en organismo con infección leve, el cambio sigue un curso normal, aun que con inclusiones de la bacteria (flechas). C) Transición en organismo con infección media, el epitelio con inclusiones cambia, presenta hiperplasia (Hp) y el desprendimiento de células, aunque la transición sigue normalmente (flechas). D) Transición en organismo con infección severa, la transición no se observa con claridad, la destrucción del epitelio es generalizada y el tejido conectivo domina en la superficie.....	39

Lista de tablas

Figura		Página
1	Escala de grados de intensidad, de acuerdo al número de inclusiones.....	20
2	Componentes de la reacción para PCR.....	21
3	Condiciones de amplificación para los fragmentos de <i>Candidatus X. californiensis</i>	22
4	Prevalencia en porcentaje, de <i>Candidatus Xenohaliotis californiensis</i> en <i>H. fulgens</i> y <i>H. corrugata</i>	24
5	Porcentaje de machos, hembras e indiferenciados en las temporadas muestreadas.....	24
6	. Porcentaje de organismos de acuerdo al grado de intensidad, observado durante el estudio, en <i>H. fulgens</i>	27
7	Porcentaje de organismos de acuerdo al grado de intensidad, observado durante el estudio, en <i>H. corrugata</i>	28

Capítulo 1. Introducción

1.1 Haliótidos

Los abulones son moluscos gasterópodos, que pertenecen al género *Haliotis*, se caracterizan por presentar una concha dextrógira con aberturas marginales, la parte interna de la concha es nacarada, presenta tentáculos epipodiales y una rádula (Lindberg, 1992). Se distribuyen a lo largo de las costas rocosas de Australia, Japón y Noroeste de América, y las zonas con mayor diversidad de especies son el Sur, centro del Pacífico y el océano Índico. En América se distribuyen desde Sitka en Alaska hasta Cabo San Lucas en Baja California Sur (Cox, 1962). De las ocho especies de Haliótidos que habitan en Norteamérica, siete se encuentran en la costa oeste de la Península de Baja California: abulón azul (*Haliotis fulgens* Philippi, 1845), abulón amarillo (*H. corrugata* Wood, 1828), abulón negro (*H. cracherodii* Leach, 1814), abulón rojo (*H. rufescens* Swaison, 1822), abulón chino, (*H. sorenseni* Bartsch, 1940), abulón rayado (*H. kamtschatkana assimilis* Dall, 1878) y abulón blanco (*H. walallensis* Stearns, 1899) (Geiger y Poppe, 2007).

Posición taxonómica de las especies de abulón del presente estudio

Phylum: Mollusca

Clase: Gasterópoda

Subclase: Prosobranchia

Orden: Archeogastropoda

Suborden: Zygobranchia

Familia: Haliotidae

Género: Haliotis

Especies: *Haliotis fulgens* y *Haliotis corrugata*

Nombre común en México: abulón azul y amarillo respectivamente

Las zonas costeras rocosas que habitan, están asociadas principalmente a mantos de algas y pastos marinos, que utilizan como alimento en el estado adulto. El tipo de vegetación depende de la profundidad en la que se encuentren (Cox, 1962). Por ejemplo, en el caso de *H. fulgens* que habita a una profundidad de 3 a 6 m, se encuentran pastos marinos como *Phyllospadix scouleri* y *P. torreyi*. En el caso de *H. corrugata* que se encuentra a una profundidad de 6 a 24 m, predominan algas y pastos marinos como *Macrocystis* sp, *Egregia* sp, *Phyllospadix* sp, *Eisenia* sp y *Pterygophora* sp. Como se ha mencionado, dichas algas y pastos forman parte de su dieta (Leighton, 2000). En la etapa juvenil ambas especies se alimentan de diatomeas y son de hábitos nocturnos, con fototropismo negativo (Hahn, 1989).

Su reproducción es dioica y se puede identificar el sexo de los organismos por la coloración de la gónada. El color de la gónada grávida se puede observar a la altura de la glándula digestiva. La gónada de los machos presenta una coloración blanca y la gónada de las hembras es de color verde (Hahn, 1989)

1.2 Sistema digestivo de abulón

Dado que la infección por *Candidatus Xenohaliotis californiensis* ocurre en el sistema digestivo del abulón, se hará una descripción del mismo. El sistema digestivo de los abulones inicia en la cavidad oral que contiene una rádula cuya función es triturar el alimento. El sistema continúa con el esófago donde se ubican dos tipos de células, las mucosas y las secretoras. El esófago se divide en tres porciones, anterior; que comienza desde la separación de la rádula y la víscera a la bolsa del esófago, esta parte marca el inicio de la zona media y la posterior comienza de la parte final de la bolsa del esófago al inicio del estómago; dicha zona tiene papilas en la pared que aumentan la superficie del esófago y las células son de tipo cilíndrico. El esófago desemboca en el estómago, cuyo epitelio es típicamente cilíndrico, aunque puede variar

en el tamaño de las células en función de la ubicación y momento fisiológico en que se encuentren Bevelander (1988).

El estómago se divide en dos partes; la primera recibe el alimento y lo prepara para la digestión se une a la segunda por una válvula semicircular, la segunda parte presenta una extensión en forma de espiral que conduce a la bolsa del ciego, que conecta con la glándula digestiva, ésta conexión sirve para enviar secreciones formadas por los divertículos de la glándula digestiva. El epitelio de la glándula digestiva está formado por dos tipos celulares: las células del ducto o alfa, que son de forma cilíndrica, con el núcleo localizado en la parte basal y con vacuolas en la parte apical, con presencia de enzimas responsables del metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos. El otro tipo de células, conocido como células crípticas o beta se caracterizan por teñir oscuro; se localizan entre las células del ducto y un núcleo oval en la zona basal y cuentan con varios gránulos de hierro. Estas células en conjunto forman una estructura de racimo. La parte final del estómago tiene una válvula donde inicia el intestino, el cual tiene una superficie de digestión y absorción, que se caracteriza por tener una doble pared que aumenta dicha superficie, llamada tiflosol. La parte final llamada recto, se caracteriza por tener una válvula la ausencia de epitelio gástrico, está cubierta de numerosas células mucosas y tiene varios pliegues (Fig. 1). No se ha descrito, ha nivel histológico la morfología, de los túbulos y divertículos de la glándula digestiva del abulón

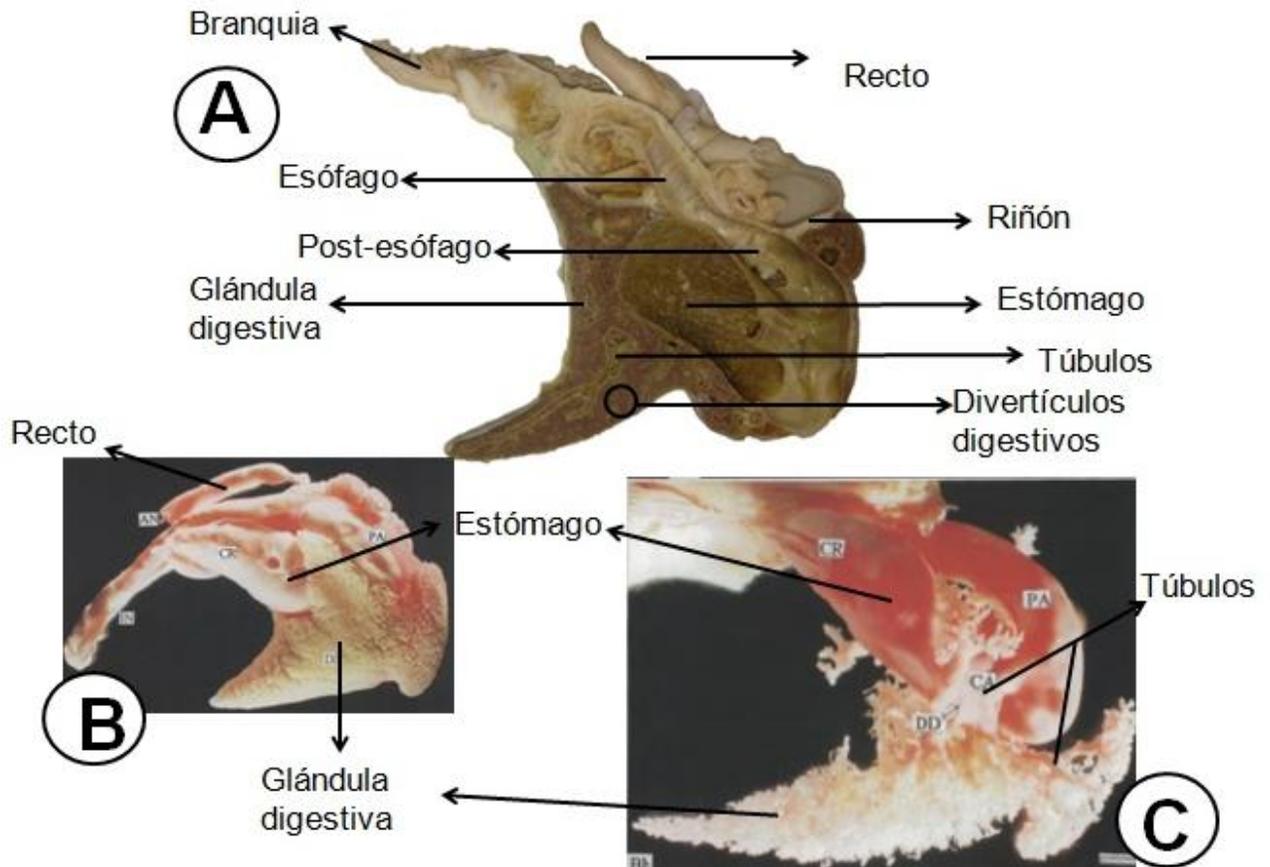


Figura 1. Anatomía del abulón. A, víscera de abulón conservada en el laboratorio de patología de organismos acuáticos resultado de esta tesis, B y C abulón preparado mediante la técnica de resina por Yamamoto, K., Handa, T y Kondo, M. (2005).

1.3 Pesquería del abulón

A nivel mundial, La actividad la su producción en 2012 alcanzó los 77.4 millones de toneladas en 2012. La mayor producción se registro en el Pacífico, para el cual, la zona noreste que abarca del Mar de Bering occidental hasta la costa del Pacífico de EUA 40°30'N y aportó el 27%; la zona centro-oeste localizada desde 40°30'N en EUA hasta la frontera de Panamá a Colombia el 15%, y la zona sureste que abarca de la frontera de Colombia hasta la división de Chile con Argentina, que aportó el 10%. (FAO, 2012). Uno de los recursos importantes de la región noreste y centro-oeste, es el abulón. Que se captura de manera deportiva en EUA y comercialmente en la Península de Baja California, México. En la zona de pesca comercial del territorio mexicano existen 22 sociedades cooperativas dedicadas al aprovechamiento de este recurso que es muy

apreciado por su carne y alcanza altos precios en el mercado asiático (Ponce-Díaz *et al.*, 2003).

La pesquería de abulón inició en México en 1860 por inmigrantes chinos, posteriormente fue controlada por japoneses y después de la segunda guerra mundial, la pesquería pasó a manos de los pescadores mexicanos (Cox, 1962). Debido a que la pesquería de abulón tiene gran significado económico a nivel nacional, esta es regulada por la Secretaría de Pesca mediante la normativa NOM-005-PESC-1993, que entre otros aspectos determina cuatro zonas para el otorgamiento de concesiones para la captura (Fig.2), que se describen a continuación:

- La zona I, que abarca desde la línea divisoria Internacional con Estados Unidos de América, hasta punta Malarrimo, incluyendo Isla Guadalupe, San Benito y Cedros. Las coordenadas son: Punta Malarrimo 27°47'30'' Norte, 114°32'30'' Oeste siguiendo el meridiano 114°32'20'' Oeste hasta el paralelo 27°57' Norte.
- La zona II, comprende desde punta Malarrimo 27°47'30'' Norte, 114°32'20'' Oeste y siguiendo por este meridiano, hasta el paralelo 27°57' Norte y extendiéndose por el meridiano sur.
- La zona III, inicia en el primer tercio noreste de Bahía Asunción, Baja California Sur (BCS), hacia el sureste, hasta Punta Holocomb (Laguna San Ignacio, BCS), incluyendo todas las islas adyacentes. Las coordenadas son: 27°09' Norte, 114°13' Oeste a 26°42'20'' Norte y 113°15'50'' siguiendo este meridiano.
- La zona IV, desde Punta Holocomb (Laguna de San Ignacio, BCS) localizada a 26°42'20'' Norte, 113°15'50'' Oeste, siguiendo este meridiano, hasta la desembocadura del Arroyo Conejo, localizado a 23°55'35'' Norte y 111°08'00'' Oeste con rumbo 40° suroeste (Fig. 2).

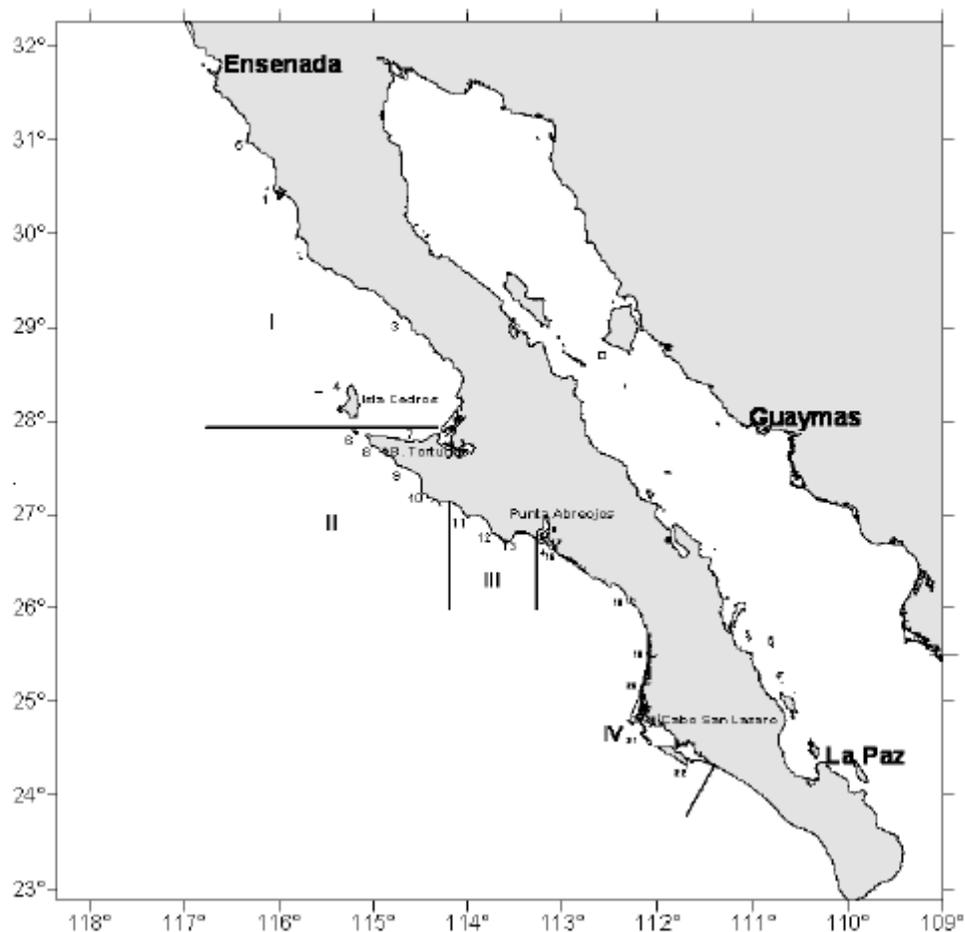


Figura 2. Delimitación de las zonas de captura de abulón establecidas por la autoridad pesquera Nacional para el otorgamiento de permisos. También se señala la ubicación de las cooperativas pesqueras en la península de Baja California, México (INAPESCA, 2006).

La composición por especie de la captura ha ido cambiando a través del tiempo en función de la abundancia de las especies, observándose que el abulón azul ha sido la especie dominante en la captura los últimos años (Fig. 3).

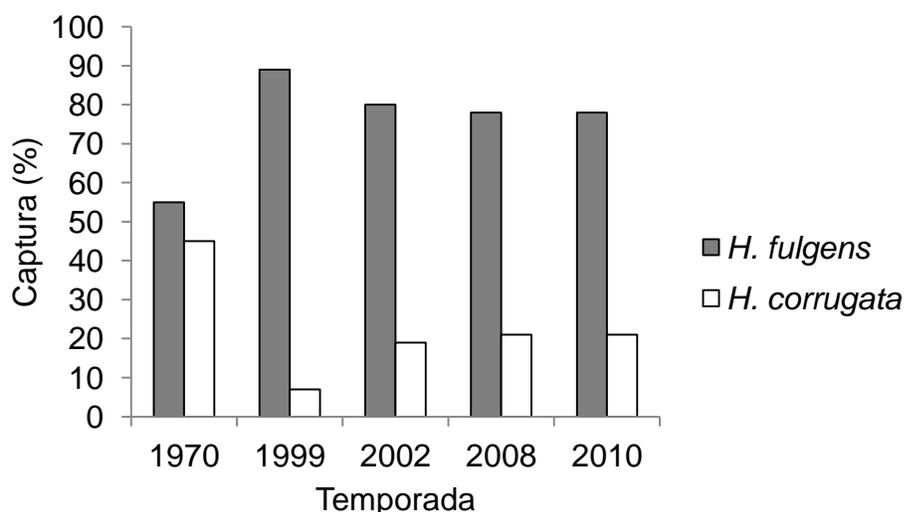


Figura 3. Composición de la captura de abulón azul y amarillo expresada en porcentaje. Fuente: (Carta Nacional Pesquera 2000, 2004, 2010 y 2012).

Históricamente, se ha registrado un descenso continuo en el volumen de captura. En la década de los cincuenta se obtuvo el valor máximo, que alcanzó unas 5,900 toneladas, para el año 2012 se registraron 102 toneladas (Fig. 4). Este descenso en la pesca de abulón tiene un gran impacto social, ya que amenaza la fuente de empleo de al menos 20 mil personas que viven de la actividad (Fernández, 2012).

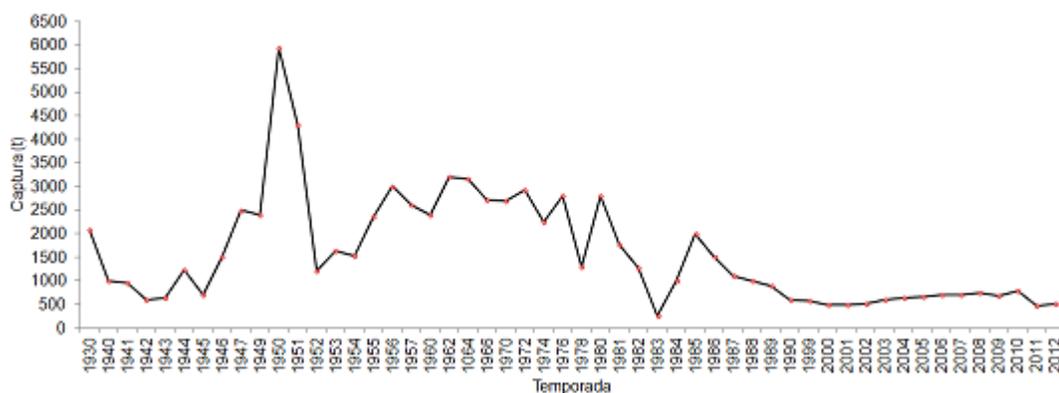


Figura 4: Serie histórica de la captura de abulón en México.(Anuarios Estadísticos de Pesca SAGARPA-CONAPESCA 1980-2012., Cariño y Montefore 2008).

Las causas específicas de esta disminución no son del todo, claras por lo que se han realizado estudios con diversos enfoques para determinarlas (Cáceres-Martínez *et al.*,

2011). Entre ellas, su posible relación con enfermedades, enfoque al que corresponde el presente trabajo.

1.4 Mortalidades de abulón asociada a agentes patógenos

Episodios de mortalidad inusual de abulón ya habían sido observados desde los años cincuenta, dichos sucesos se registraron en poblaciones de abulón amarillo y abulón negro en EUA (Cox, 1962). Sin embargo, el primer registro bien documentado de mortalidades masivas se realizó en 1986 en poblaciones de abulón negro en la Isla Santa Cruz en California, EUA; estas mortalidades alcanzaron valores de hasta el 99% de la población (Haaker *et al.*, 1992). El episodio fue detectado por la gran cantidad de organismos muertos y moribundos varados en las playas, además los animales moribundos se desprendían con facilidad del sustrato lo que indicaba su debilidad. Externamente, los organismos presentaban cambios en la coloración del epipodio y manto, el color iba de azul grisáceo a gris o púrpura en lugar del color normalmente negro. Las partes blandas presentaban flacidez, atrofia y no tenían respuesta a la palpación. El conjunto de estos signos y características externas de animales afectados se denominó como síndrome de deshidratación (SD) o marchitamiento (Haaker *et al.*, 1992).

Más tarde, en 1988 ocurrieron mortalidades similares en las Islas Anacapa, Santa Rosa, Santa Bárbara, San Miguel y San Clemente, California. Los estudios iniciales sobre las posibles causas de estos eventos de mortalidades indicaron que varios factores podrían estar relacionados, entre ellos la sobre pesca, la contaminación, descargas de cobre provenientes de una planta nuclear, afloramientos de dinoflagelados y tormentas (Haaker *et al.*, 1992., Steinbeck, 1992). También se asociaron las muertes a la ocurrencia de una infección renal causada por coccidios; sin embargo, no se estableció una correlación entre la infección por estos coccidios y las mortalidades masivas (Steinbeck, 1992). Entre 1985 y 1989 se registraron más eventos de mortalidad en varias especies de abulón mostrando disminuciones del 82% al 96% en abulón negro,

del 97% al 98% en abulón rojo y del 51% al 94 % en abulón amarillo (Haaker *et al.*, 1992.; Davis *et al.*, 1992).

Los estudios indicaron una asociación de los episodios de mortalidad con la ocurrencia del fenómeno de El Niño, que se caracteriza por un aumento en las temperaturas del agua que desencadenan condiciones ambientales adversas para el abulón (Moore *et al.*, 2000). Sin embargo, Lafferty (1993) concluye que el causante del SD es un agente patógeno y no directamente las condiciones provocadas por el fenómeno de El Niño. Este patógeno fue identificado como, una bacteria tipo Rickettsia a través de estudios parasitológicos e histopatológicos, realizados por Friedman *et al.* (1995) en abulón negro que provenía de la Isla Channel, donde encontraron una estrecha relación entre el SD y una procariota del orden Rickettsiales localizada en el tejido del tracto digestivo. Posteriormente, Friedman y colaboradores (1997) encuentran una compleja relación entre el desarrollo del SD con la intensidad de infección por esta bacteria tipo Rickettsia, la temperatura y la cantidad de alimento. Más adelante, se identificó a esta rickettsia mediante características morfológicas y genéticas, mediante secuenciación del gen 16S, como *Candidatus Xenohalictis californiensis* (Friedman *et al.*, 2000).

1.5 *Candidatus Xenohalictis californiensis*

Candidatus X. californiensis pertenece a la clase Proteobacteria del orden Rickettsiales y familia Rickettsiaceae (Friedman *et al.*, 2000). Esta procariota gram negativa se multiplica dentro de vacuolas citoplasmáticas de la célula hospedera que se observan a nivel histológico como inclusiones basófilas en el epitelio gastrointestinal (Friedman *et al.* 2000). Por la naturaleza intracelular obligada de la bacteria, hasta el momento no se ha podido aislar y en consecuencia, no se han podido aplicar directamente los postulados de Koch para demostrar su efecto en el desarrollo del SD. Sin embargo, su papel en el desarrollo de esta enfermedad fue corroborado mediante la aplicación de (oxitetraciclina) en abulones con signos externos del SD, los cuales recuperaron su estado de salud normal al ser tratados con este antibiótico (Friedman *et al.* 2003). El tratamiento con la oxitetraciclina mediante baños e, inyecciones o bien incorporada en el alimento, es utilizado actualmente en abulones con SD (Esquivel-García, *et al.*, 2011).

Más recientemente, los estudios realizados por Friedman y Crosson (2012) han demostrado que existen variantes morfológicas de las inclusiones formadas por *Candidatus X. californiensis* en los tejidos infectados. Además, mediante microscopía electrónica de transmisión, se ha evidenciado, que algunas inclusiones de la rickettsia se encuentran infectadas por un fago, demostrándose un hiperparasitismo. Actualmente, se está analizando si la presencia del fago influye en la patogénesis del SD.

1.6 Daños a nivel tisular atribuidos *Candidatus Xenohaliotis californiensis*

Las lesiones observadas en los epitelios explican, en algunos casos, la apariencia externa de los organismos. Las lesiones descritas por Gardner *et al.* (1995) indican un cambio del epitelio de los divertículos digestivos por un epitelio parecido al que recubre el intestino, denominando a esta alteración metaplasia. Estos autores indican que los divertículos al contener las inclusiones bacterianas se organizan en células de absorción (células cilíndricas), en consecuencia se destruye la arquitectura normal de la glándula digestiva y se reduce la producción de enzimas dando como resultado una apariencia externa de caquexia por la incapacidad de absorber nutrientes.

Curiosamente, no se ha elaborado a la fecha una descripción detallada de la apariencia y morfología de túbulos y divertículos digestivos que permitan discernir entre una condición normal, resultado de un proceso fisiológico o de una patología.

Por su parte Valles-Ríos (2000) describe que al iniciar la infección bacteriana, las células presentan hipertrofia provocando presión en las células aledañas. La gravedad de las lesiones depende del número de inclusiones que se encuentren en el epitelio y puede llegar hasta desprendimiento del mismo. Además los túbulos del hepatopáncreas se observan atrofiados, adquiriendo las células de los divertículos una apariencia aplanada que, aumenta la luz de estos.

1.7 Disminución de abulón en México y su relación con el síndrome de deshidratación

En México el primer estudio sobre la posible presencia del SD en poblaciones afectadas por episodios de mortalidades inusuales en zonas pesqueras, se realizó en el abulón negro *H. cracherodii*. En este estudio se encontraron las inclusiones características formadas por la rickettsia *Candidatus X. californiensis* en el epitelio digestivo, sobre todo en esófago, intestino y epitelio cilíndrico de los conductos de la glándula digestiva (Valles-Ríos, 2000). Por su parte, Cáceres-Martínez y Tinoco-Orta (2001) observaron la presencia de las inclusiones asociadas a la rickettsia en células epiteliales del tracto digestivo de abulón rojo (*H. rufescens*), tanto de animales moribundos como aparentemente sanos. Posteriormente, la presencia de las inclusiones en *H. fulgens* y *H. corrugata* en Isla de Cedros e Islas Benito fue reportada por Álvarez (2000) y Álvarez-Tinajero, *et al.* (2002). Estos estudios mostraron que no había relación entre la intensidad de las inclusiones los signos externos del SD y el grado de degeneración de la glándula digestiva en ambas especies, contrario a lo encontrado en abulón negro por Friedman *et al.* (1997). Cáceres-Martínez (2002), indica que los pescadores de Baja California, han registrado episodios de mortalidades masivas de abulón negro y otras especies de abulón, asociadas con el fenómeno de El Niño. Sin embargo su relación con el patógeno *Candidatus X. californiensis* causante de la enfermedad del SD se desconoce. Por lo que más adelante, Cáceres-Martínez, *et al* (2011) demuestran mediante estudios histológicos y de hibridación *in situ con*, sondas específicas, que las inclusiones asociadas a la rickettsia encontradas en los abulones negro, rojo, azul y amarillo en México, corresponden a *Candidatis X. californiensis* .

Aunque se ha demostrado la presencia de *Candidatus X. californiensis* en las especies de México, aun no se cuenta con reportes que establezcan una clara asociación con el SD y con los episodios de mortalidad masiva en México (Cáceres-Martínez *et al.* 2011).

Recientemente, Cruz-Flores *et al.* (2013) demuestran que *Candidatus X. californiensis* está ampliamente distribuido en la principal zona de captura y se ha confirmado que, en abulones infectados en aguas Mexicanas, también aparecen los dos tipos de inclusiones encontradas por Friedman *et al.* (2012), lo que sugiere la presencia del hiperparasitismo (Cruz-Flores *et al.* 2013). Respecto a la descripción de daños tisulares asociados con esta procariota en especies de abulón en México es incompleta, únicamente se ha mencionado que las células presentan hipertrofia cuando la bacteria está presente, así como desarreglo de la arquitectura normal y desprendimiento del epitelio (Cruz-Flores *et al.* 2013).

Si bien se cuenta ya con información básica sobre la presencia de *Candidatus X. californiensis* en México, aún no se cuenta con suficiente información epizootiológica que nos permita conocer su desarrollo e impacto a nivel poblacional, por ejemplo su distribución por sexos. Tampoco se cuenta con información sobre la patogénesis de la infección a nivel tisular ni su relación con los signos que presenta el SD en *H. fulgens* y *H. corrugata* que sostienen la pesquería comercial.

Capítulo 2. Justificación

2.1 Justificación

La presencia de enfermedades en abulones *H. fulgens* y *H. corrugata* en la península de Baja California, podrían ser un factor importante en la disminución de la producción por las pesquerías.

Se sabe que *Candidatus X. californiensis*, agente causal del SD, se encuentra presente en la zona de captura comercial en México. Sin embargo, se desconoce su distribución, prevalencia e intensidad (epizootiología) en dicha zona, y su relación con el sexo de los abulones.

No existe descripción de la apariencia ni la morfología de los túbulos y divertículos de la glándula digestiva en abulones no infectados por *Candidatus X. californiensis*, por lo que es indispensable dicha descripción para poder diferenciar los cambios asociados con procesos fisiológicos naturales, de cambios causados por eventos patológicos.

Capítulo 3. Hipótesis

3.1 Hipótesis

La prevalencia e intensidad de *Candidatus X. californiensis* sigue un patrón similar entre las poblaciones silvestres de abulón *Haliotis fulgens* y amarillo *Haliotis corrugata* dentro de la zona de pesquería en la península de Baja California, sin presentar relación con el sexo de los organismos.

La anatomía y morfología de túbulos y divertículos digestivos de abulones estudiados sigue un patrón similar al de otros moluscos.

El daño tisular asociado con la presencia de *Candidatus X. californiensis* es similar al descrito en otras especies de abulón, como *H. cracherodii* y *H. rufescens* en EUA:

3.2 Objetivo general

Determinar la prevalencia e intensidad de *Candidatus X. californiensis* y su relación con el sexo en los abulones *H. fulgens* y *H. corrugata* obtenidos de las principal zona pesquera del abulón en la península de Baja California, México en Abril de 2012, Noviembre de 2012 y Mayo 2013. Así como describir la apariencia y morfología de los túbulos y divertículos digestivos en abulones no infectados y los daños tisulares asociados con el patógeno *Candidatus X. californiensis* en ambas especies.

3.3 Objetivos particulares

- Determinar la prevalencia e intensidad de *Candidatus X. californiensis* en abulón azul y amarillo en la principal zona pesquera mediante la técnica histológica.
- Determinar la prevalencia e intensidad de *Candidatus X. californiensis* en machos y hembras de ambas especies.
- Confirmar la presencia de *Candidatus X. californiensis* con la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Describir la anatomía y morfología de los túbulos y divertículos digestivos en abulones no infectados.
- Describir los daños tisulares asociados con *Candidatus X. californiensis* en abulón azul y amarillo.
- Determinar si el daño tisular asociado con *Candidatus X. californiensis* es similar al descrito para el abulón negro y rojo en EUA:

Capítulo 4. Materiales y métodos

4.1 Obtención de muestras

En Noviembre de 2012 y Mayo de 2013 se obtuvieron 201 organismos de la pesquería comercial de abulón, de ellos 134 correspondieron a *H. fulgens* y 67 a *H. corrugata*. Así mismo para ampliar los resultados del presente estudio con relación a la posible asociación de la infección por *Candidatus X. californiensis* y el sexo del organismo, se incluyeron datos reportados por Cruz-Flores (2013), quien realizó el muestreo de 177 abulones en el mes de Abril de 2012 y obtuvo 65 abulones azules y 112 amarillos. De esta manera el total de abulones considerados para detectar esta posible asociación fue de 199 azules y 179 amarillos.

Las zonas donde se realizaron los tres muestreos fueron la II y III ubicadas en los estados de Baja California y Baja California Sur en México de acuerdo con la clasificación de zonas pesqueras del CONAPESCA mencionadas anteriormente (Fig.2). Siete Sociedades Cooperativas participaron; La Purísima, Buzos y Pescadores, Bahía tortugas, Emancipación, California de San Ignacio, Progreso y Punta Abrejos (Fig.5).

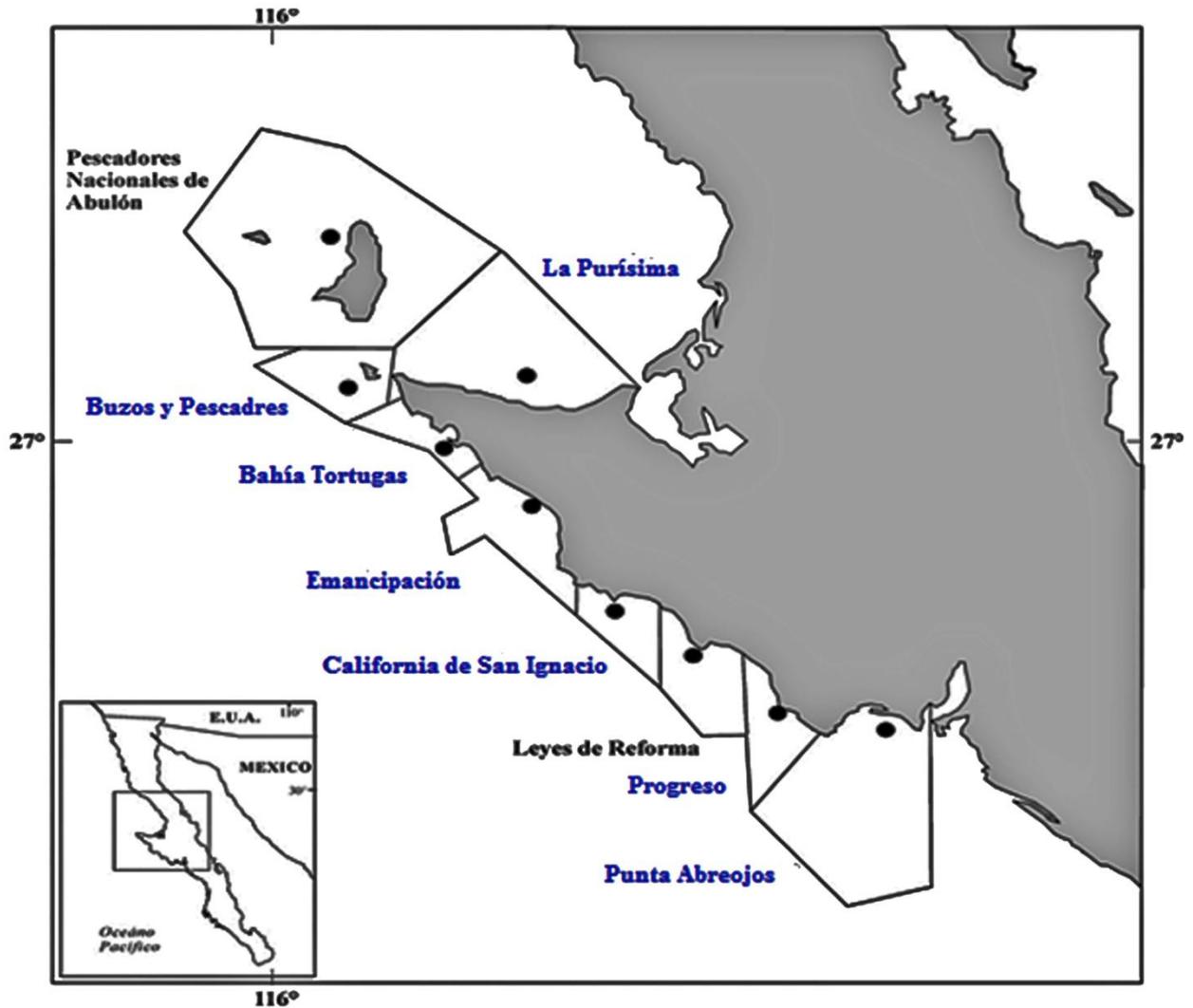


Figura 5. Zona de muestreo de para *H. fulgens* y *H. corrugata*. Las cooperativas que participaron en el muestreo marcadas con azul.

4.2 Análisis en fresco y preservación de las muestras

Los organismos se analizaron en fresco, en los puntos de recolección, y se registraron los datos en un formato preestablecido, que incluyó; número de individuo, nombre de la cooperativa, tamaño del organismo, sexo y apariencia externa (Anexo 1).

Posteriormente la masa visceral de cada individuo fue correctamente identificada, infiltrada con solución de Davidson, envuelta en gasa y se colocaron en envases plásticos, adicionando solución de manera que cubriera todo el tejido para asegurar su preservación.

4.3 Análisis histológico

Se realizó la disección del cuerpo blando y se obtuvieron fracciones con un grosor aproximado de 5 mm de esófago posterior, glándula digestiva, y gónada (Fig.6). Los tejidos se colocaron en casetes para histología y se deshidrataron siguiendo el protocolo de Howard y Smith (1993) (Anexo 2). Los tejidos se incluyeron en parafina.

Con un microtomo se obtuvieron cortes de 5µm de tejido que fueron montados en laminillas histológicas y teñidos con hematoxilina-eosina (Shaw y Battle, 1957). La revisión de las laminillas histológicas se realizó con un microscopio de luz a diferentes aumentos (10, 40 y 100). El sexo de los organismos se identificó mediante la observación de la gónada, mientras que la presencia de las inclusiones rickettsiales se buscó en los cortes de esófago posterior y glándula digestiva. Así mismo se realizó una descripción de los daños tisulares asociados a la presencia de las inclusiones. Paralelamente, se seleccionaron abulones no infectados y se hizo una descripción de los túbulos y divertículos así como su morfología, tomando como base las descripciones del desarrollo ontogénico de la glándula digestiva descritas para la almeja *Lasaea rubra* y el camarón *Pleoticus molleri* (Morton, 1956; Cuartas y Petriella, 2002). Además se realizó registro fotográfico.

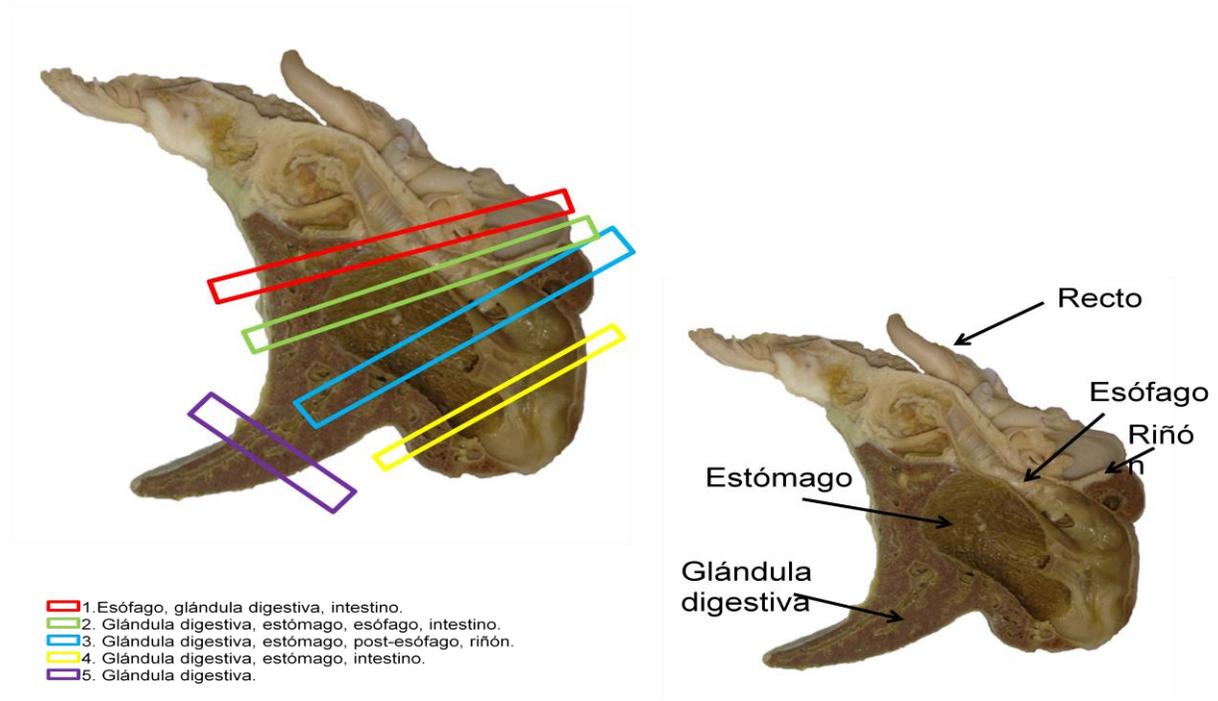


Figura 6. Ubicación de los cortes en el tejido blando para la realización del análisis histológico.

4.4 Prevalencia y grados de intensidad

La prevalencia de *Candidatus X. californiensis* se determinó considerando el número de organismos en los que se observó la presencia de las inclusiones, en la población de estudio expresada en porcentaje (Cáceres-Martínez, Vásquez-Yeomans y Padilla-Lardizabal, 2010). La ecuación para obtener la prevalencia es:

$$PE\% = (OI/OA) * 100.$$

Dónde:

PE%= Porcentaje de abulones infectados en la población estudiada.

OI= número de abulones infectados

OA= número de abulones analizados

Para determinar la intensidad de infección se contabilizaron y sumaron las inclusiones observadas en cada corte histológico correspondiente a los epitelios digestivos y glándula digestiva de varias zonas anatómicas de cada organismo (Tabla 1). El número total de inclusiones fue comparado con las alteraciones histológicas observadas en los tejidos infectados permitiendo establecer una escala relativa (Tabla 1).

Tabla 1. Escala de grados de intensidad, de acuerdo al número de inclusiones observadas en el corte histológico.

Total de inclusiones observadas	Grado de intensidad	Alteraciones morfológicas
1-500	1	Leve
501-1000	2	Medio
> 1001	3	Severo

Cabe remarcar que los límites de los rangos de los números de inclusiones establecidos corresponden a signos cualitativos y que estos son graduales por lo que la clasificación numérica en sus límites superiores no es exacta.

4.5 Confirmación de la identidad del parásito mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para confirmar la presencia de *Candidatus X. californiensis* se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Las muestras de esófago posterior que fueron positivas en análisis histológico y que tuvieran una intensidad de grado tres se utilizaron para la extracción de ADN.

El tejido del esófago posterior fue, fragmentado con nitrógeno líquido y se colocaron 25mg de muestra en micro tubos para su extracción utilizando el Dneasy Blood and

Tissue kit de Quiagen® siguiendo las instrucciones del fabricante (Research Molecular Center, Inc., E.U.A).

La concentración y calidad del ADN fue analizada mediante espectofotometría utilizando Nanodrop 200 (Thermo Scientific®). Posteriormente, se amplificó un fragmento del rADN para rickettsia con los iniciadores RA5-1 5'-GTT-GAA-CGT-GCC-TTC-AGT-TTA-C-3', RA3-6 5'-ACT-TGG-ACTCAT-TCA-AAA-GCG-GA-3', RA3-8 5'-CCA-CTG-TGA-GAT-AAA-GCA-3', de los cuales se obtuvo un producto de 160 pares de bases (pb) (Andree, *et al.*, 2000. Cáceres-Martínez *et al*, 2011). Los componentes y las condiciones de PCR se muestran en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Componentes de la reacción para PCR.

Componente	Cantidad (µL)1X
Amortiguador 10X para <i>Taq</i>	2.0
Iniciador 3-6 (10µM)	0.5
Iniciador 5-1 (10 µM)	0.5
dNTP's (10mM)	0.4
BSA 10mg/ml)	0.8
<i>Taq</i> polimerasa (5U/µl)	0.32
Agua grado biología molecular	14.48

Como referencia se utilizó ADN de *H. cracherodii* infectado con la bacteria como control positivo y como control negativo se sustituyo la cantidad de ADN por agua estéril. Las condiciones de amplificación se indican en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de amplificación para los fragmentos de *Candidatus X. californiensis*.

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	95°C 40 ciclos (2,3 y 4)	5 min	Precaentado
2	95°C	1min	Desnaturalización
3	62°C	30s	Hibridación
4	72°C	30s	Elongación
5	72°C	10min	Extensión

Para detectar los fragmentos de PCR se utilizó la técnica de electroforesis. La reacción se colocó en un gel de agarosa al 2%, con un marcador de peso molecular de 0.1 a 2 Kpb a una concentración de 1µg/µl como referencia de tamaño. Las condiciones para la electroforesis fueron 1.15 h a 100 V. Para visualizar los amplicones obtenidos, el gel se colocó en una solución con Gel Red™ durante 20 min, posteriormente se irradió con luz UV mediante un foto-documentador.

Capítulo 5. Resultados

5.1 Distribución y prevalencia de *Candidatus Xenohaliotis californiensis*, por especie y sexo

La talla promedio medida en los abulones provenientes de la captura comercial colectados fue de 15.07 ± 2.33 cm para abulón azul y 14.20 ± 1.99 cm para abulón amarillo.

La prevalencia de *Candidatus X. californiensis* en las zonas de captura observadas en Noviembre 2012, para abulón azul fue de; 77% en La Purísima (LP), 78% en Buzos y pescadores (IN), 80% en Emancipación (EM), 55% en Progreso (P), 60% en Punta Abreojos (PA). Mientras que la prevalencia en abulón amarillo fue de; 47% en LP, 45% en IN y 83% en EM (Fig.7).

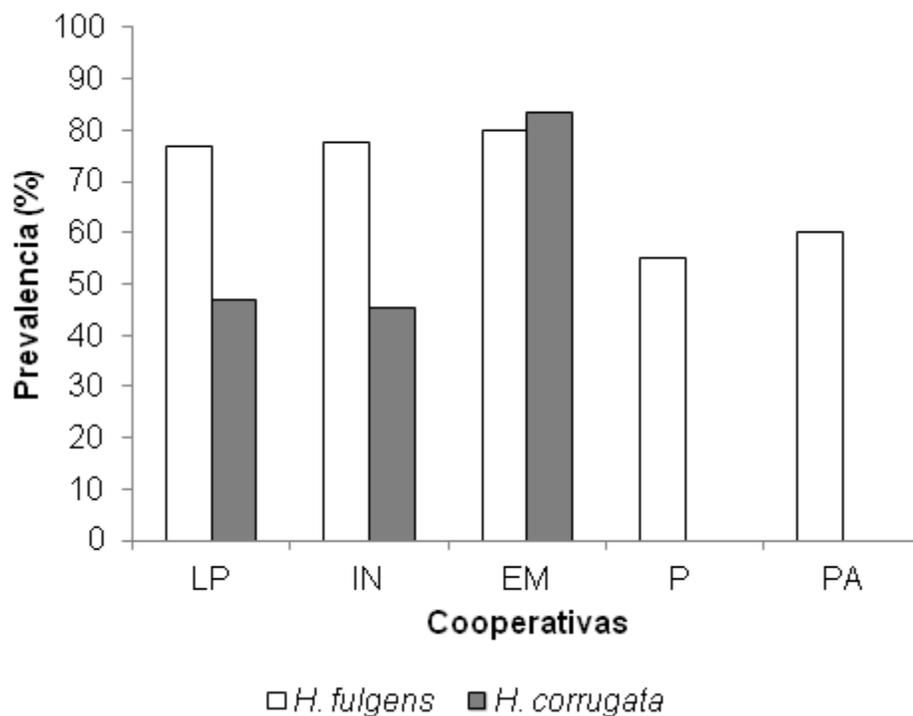


Figura 7: Prevalencia de *Candidatus X. californiensis* en *H. fulgens* y *H. corrugata*. En noviembre de 2012. **No incluye las cooperativas Bahía tortugas y California de San Ignacio escaso número de muestras.

La prevalencia observada de *Candidatus X. californiensis* en abulón azul y amarillo, capturados en los diferentes meses, se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Prevalencia en porcentaje, de *Candidatus X. californiensis* en *H. fulgens* y *H. corrugata*.

Temporada de captura	<i>Haliotis fulgens</i>	<i>Haliotis corrugata</i>
Abril/12	95	66
Noviembre/12	71	52
Mayo/13	94	-

Mayo 2013 solo participo la cooperativa Emancipación.
-; no hubo muestra.

La prevalencia promedio de *Candidatus X. californiensis* observada de 2012 a 2013 fue; $87\% \pm 14$ para abulón azul y $59\% \pm 10$ en abulón amarillo.

El porcentaje de machos, hembras y organismos indiferenciados se muestra en la tabla 5. La proporción macho: hembra total observada para *H. fulgens* fue 1:1.3 y para *H. corrugata* 1:1.4.

Tabla 5. Porcentaje de machos, hembras e indiferenciados en las temporadas muestreadas.

Temporada	<i>Haliotis fulgens</i>			<i>Haliotis corrugata</i>		
	Abril/12	Noviembre/12	Mayo/13	Abril/12	Noviembre/12	Mayo/13
Macho	43	46	46	38	35	0
Hembra	52	49	49	46	56	0
Indiferenciado	5	5	5	16	9	0

La prevalencia de *Candidatus X. californiensis* en machos, hembras y organismos indiferenciado se muestra en la figura 8. Entre paréntesis se indica el número de organismos al que corresponde el porcentaje.

En *H. fulgens* del mes de abril el porcentaje de machos positivos fue 96% (27), las hembras con 94% (32) y el 100% (3) indiferenciados. En noviembre de 2012, 72% (39)

fueron machos, 72% (42) hembras y el 50% (3) indiferenciados. En mayo 2013, 67% (2) correspondió a machos, 100% (12) a las hembras y el 100% (1) de indiferenciados presentaron la bacteria (Fig.8)

Para *H. corrugata* del mes de abril 62% (26) fueron machos, 62 % (32) hembras, y el 89% (6) indiferenciados. Por último en noviembre, 54% (12) correspondieron a machos, 54 % (20) hembras y 50% (3) indiferenciados (Fig.9).

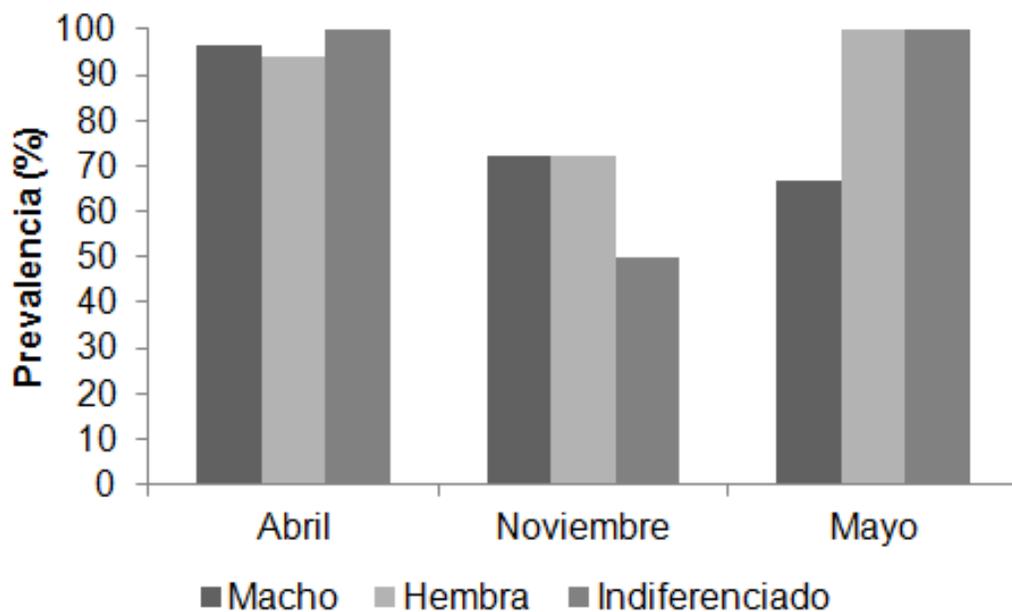


Figura 8. Prevalencia de *Candidatus X. californiensis* por sexo en *H. fulgens*, durante los meses de muestreo.

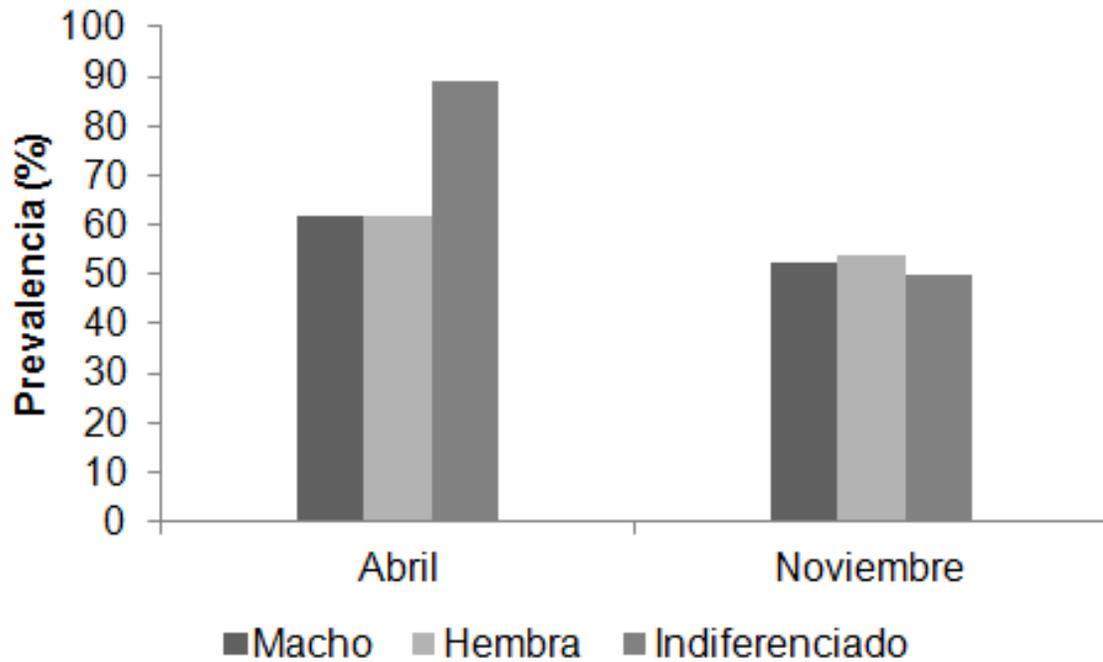


Figura 9. Prevalencia de *Candidatus X. californiensis*, por sexo en *H. corrugata*, durante los meses de muestreo.

Respecto a la prevalencia general de *Candidatus X. californiensis* en machos, hembras e indiferenciados fue; en abulón azul; $77\% \pm 17$, $89\% \pm 15$ y $83\% \pm 29$ respectivamente. En abulón amarillo; machos y hembras presentaron $58\% \pm 6$ de prevalencia del patógeno y los organismos indiferenciados el $70\% \pm 28$ (figura 10).

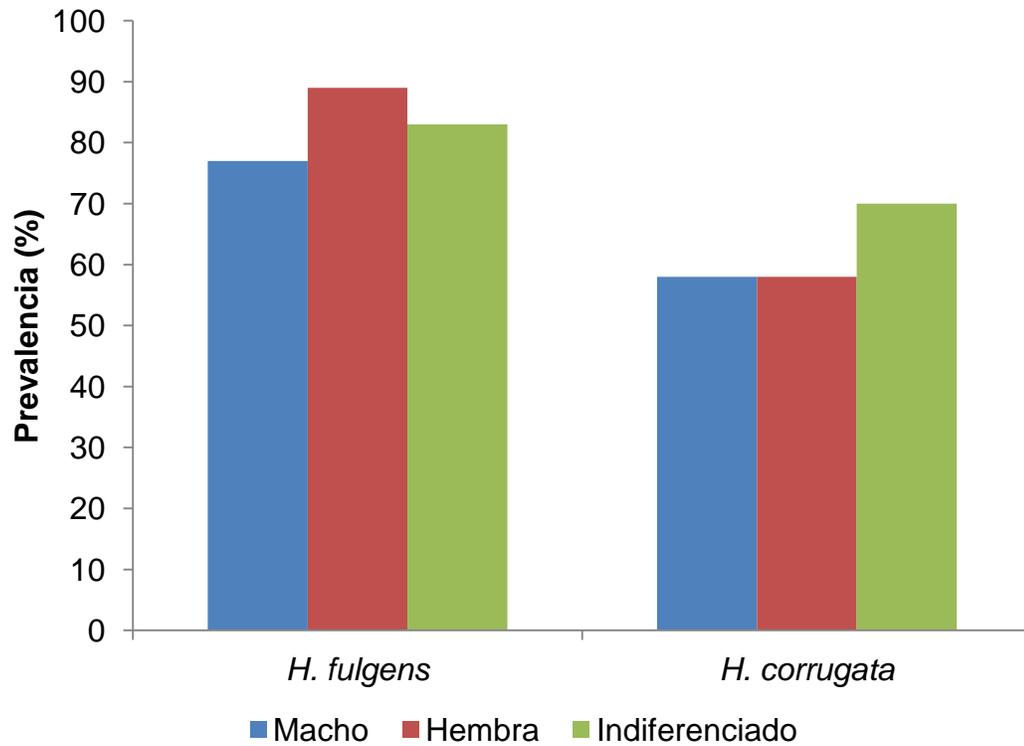


Figura 10. Prevalencia de *Candidatus Xenohaliotis californiensis* por sexo en *H. fulgens* y *H. corrugata* observada en la zona de captura durante el periodo de estudio 2012-2013.

5.2 Grados de Intensidad por especie, temporada de captura y sexo

Los grados de intensidad para *H. fulgens* y *H. corrugata* se muestran en las tablas 6 y 7. La intensidad que domina en los organismos es en grado 1.

Tabla 6. Porcentaje de organismos de acuerdo al grado de intensidad, observado durante el estudio, en *H. fulgens*.

GI	Abril			Noviembre			Mayo		
	M	H	I	M	H	I	M	H	I
1	89	59	100	90	88	67	100	83	100
2	4	9	0	10	7	0	0	0	0
3	7	31	0	0	5	33	0	17	0

Tabla 7. Porcentaje de organismos de acuerdo al grado de intensidad, observado durante el estudio, en *H. corrugata*.

GI	Abril			Noviembre		
	M	H	I	M	H	I
1	92	88	69	100	85	33
2	8	9	19	0	10	33
3	0	3	13	0	5	33

En la figura 11, se observa el porcentaje de organismos de acuerdo al grado de intensidad observado durante el periodo 2012-2013. Para *H. fulgens* en el grado uno fue, 86% \pm 15, en el grado dos, 3% \pm 4 y en el grado tres 10% \pm 13. Para *H. corrugata* en el grado uno 78% \pm 24, en el grado dos, 13% \pm 11y el grado tres 9% \pm 13.

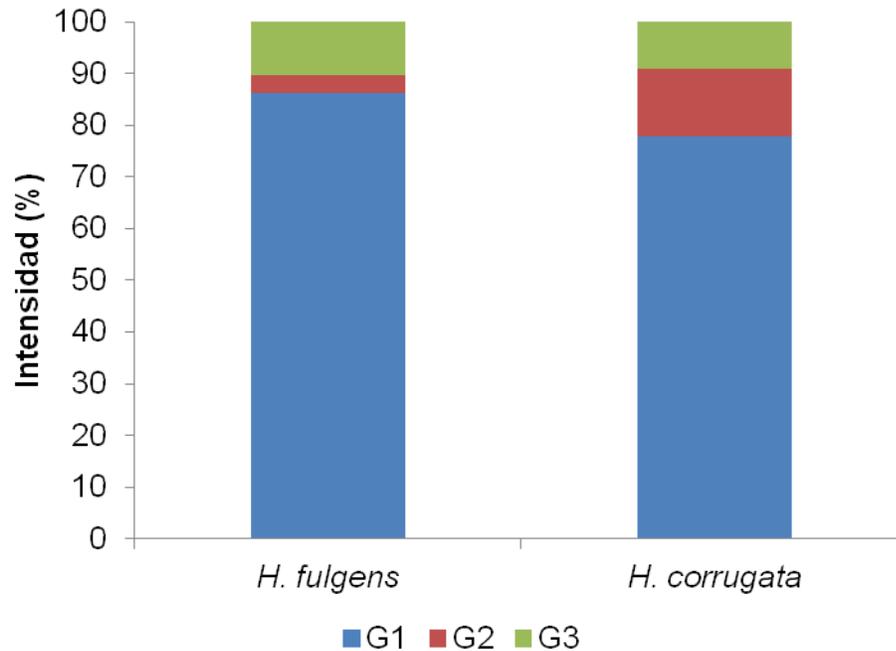


Figura 11. Intensidad de infección por especie (*H. fulgens* y *H. corrugata*.)G1, grado 1, G2, grado 2, G3, grado 3.

En abulón azul los grados de intensidad en 2012-2013, en organismos indiferenciados, machos y hembras fue; grado uno 86% y para el grado tres fue 14%. Para machos,

grado uno 90%, grado dos 7% y grado tres 3%. Para las hembras en el grado uno 77%, grado dos 7% y grado tres 16% (Fig.12).

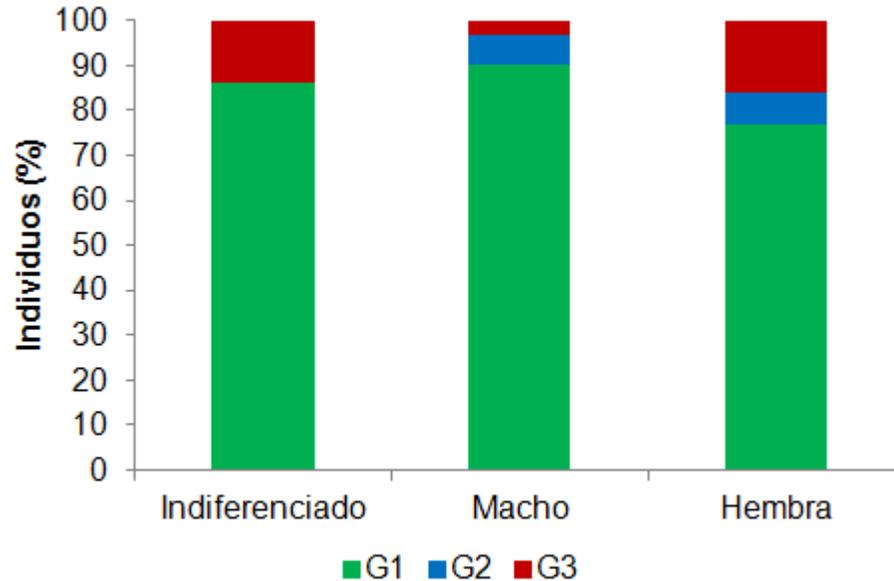


Figura 12. Intensidad de infección por sexo en *H. fulgens*. G1, grado 1, G2, grado 2, G3, grado 3.

En *H. corrugata* el 63% de los abulones indiferenciados se encontró el grado uno, en el 21% el grado dos y 3% en el grado tres. Respecto a las hembras, en el 86% se observó el grado 1, mientras que en el 10% se observó el grado dos y en el 4% el grado tres. En los machos el grado uno se detectó en el 95%, en tanto que en el 5% se observó el grado dos (Fig.3).

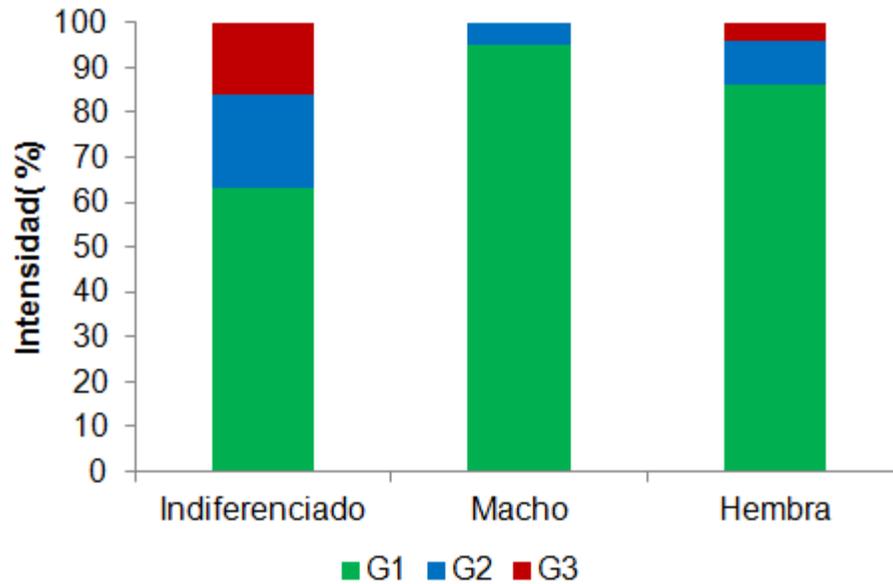


Figura 13. Intensidad de infección por sexo en *H. corrugata*. G1, grado 1, G2, grado 2, G3.

5.3 Resultado de análisis molecular por PCR

La amplificación del fragmento del gen 16S rADN de *Candidatus X. californiensis* fue positiva. Se obtuvo un fragmento esperado de aproximadamente de 160 pb. Estos resultados confirman la presencia de la bacteria en la zona de captura, estudiada.

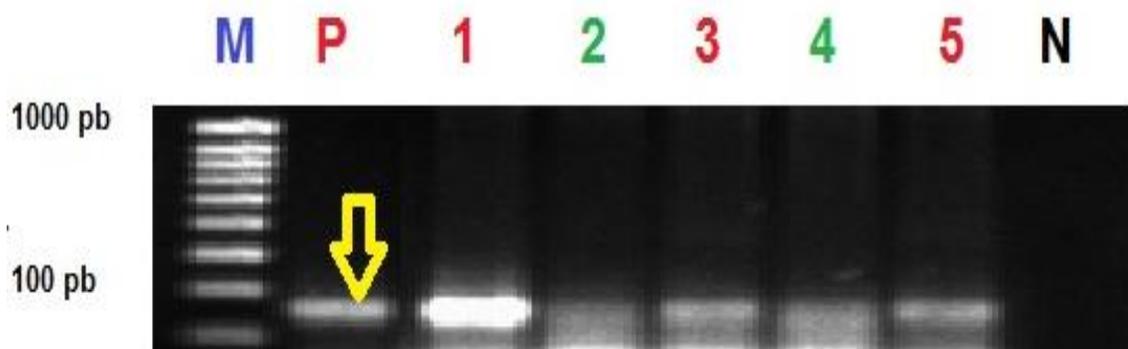


Figura 14. Detección de un fragmento de 160 pb para *Candidatus X. californiensis* en *H. fulgens* y *H. corrugata*. M, marcador molecular (1 Kb), P, control positivo *H. cracherodii*, 1-3 *H. fulgens*, 4 y 5 *H. corrugata*, N, control negativo (agua estéril). Flecha, indica el fragmento de 160 pb.

5.4 Morfología y desarrollo de la glándula digestiva en organismos sanos

Los divertículos digestivos se forman por dos tipos celulares germinales que dan origen a células de tipo glandular, uno de estos tipos celulares se caracteriza por estar agrupado en forma de abanico cerrado, tener un núcleo basal, abundantes gránulos ubicados en la zona apical que tiñen café y son de forma redondeada, las células son generalmente basofílicas. A este tipo de células se les denomina cripticas o beta. El proceso dinámico de regeneración de túbulos y divertículos digestivos permite observar al menos tres estados de desarrollo: 1 divertículos jóvenes (Fig. 15. A y B), en los que se observan células cripticas, dispuestas en forma de abanico cerrado. 2 divertículos en crecimiento (Fig.15 C), en éstos, las células cripticas agrupadas en forma de abanico se abren y aparentemente dan origen a células cilíndricas, alargadas con gránulos basales y grandes vacuolas apicales, a estas células se les conoce como células del ducto o alfa y son acidofílicas. 3. Finalmente el divertículo maduro (Fig. 15 D) que se caracteriza por un aumento en el número de células alfa y las células beta presentan una menor cantidad de gránulos, presumiblemente indicando una disminución en la capacidad de secreción enzimática. Aún en esta etapa permanecen pequeños grupos de células cripticas y los divertículos pueden unirse unos con otros independientemente del estadio de desarrollo, esta etapa se caracteriza por el aumento del espacio del lumen. Los divertículos en conjunto tienen una forma poligonal (Fig. 15 E) y entre estos se observan células seroides, que tienen una forma ovalada y dentro de su estructura se observan gránulos que tiñen café-amarillo (Fig. 15 F). En la figura 16 se muestra un diagrama de la morfología observada de la glándula digestiva.

Se observó una clara transición de los tipos celulares del epitelio que van a dar origen a los túbulos. Esta transición ocurre hacia la parte terminal de los túbulos en donde comienzan a formarse los divertículos y no representa una alteración de orden patológico (metaplasia). (Figura 19 N).

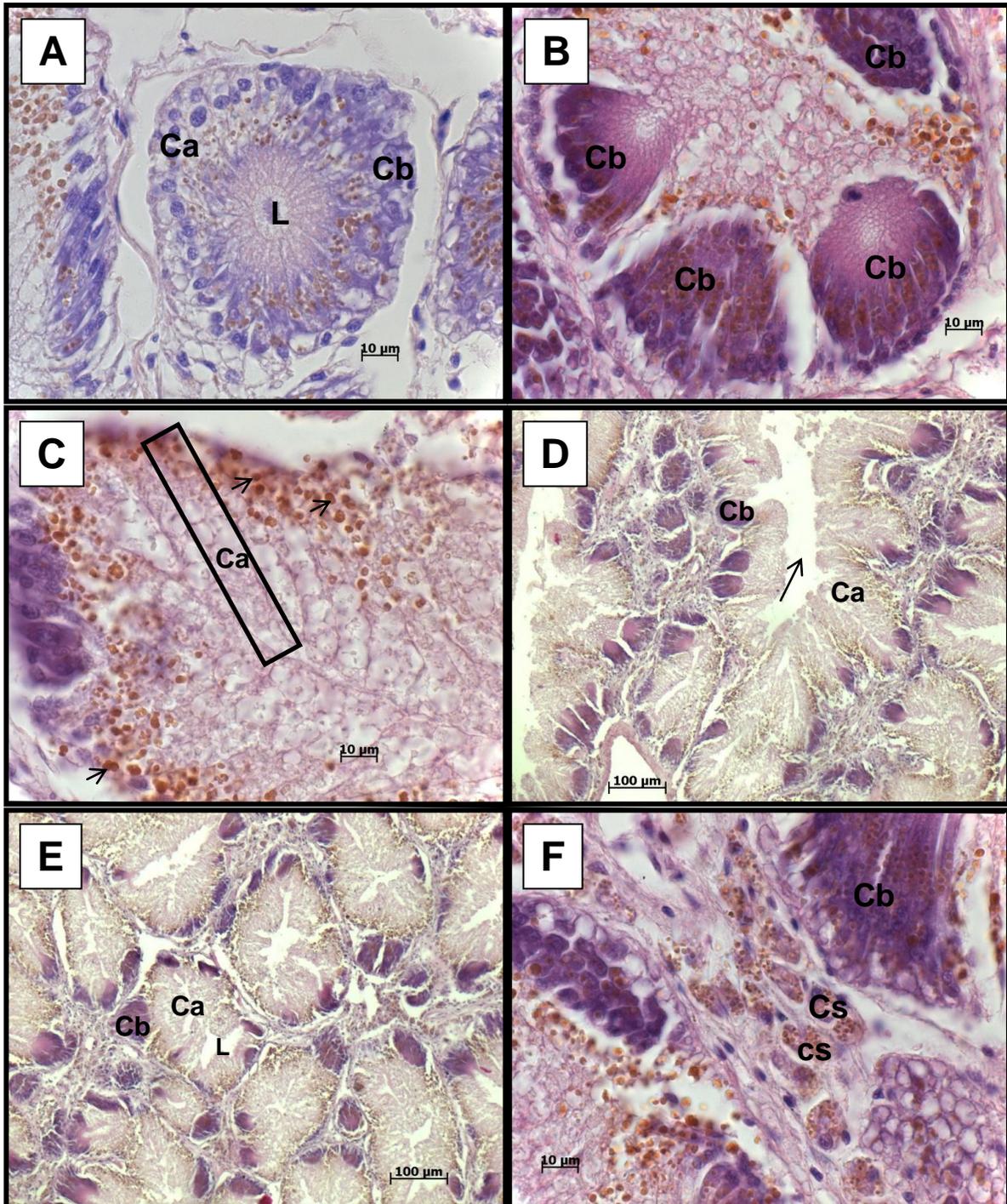


Figura 15. Estructura normal de glándula digestiva de abulón .A) Divertículo en etapa joven hacia el extremo superior derecho se observa un grupo de células beta (Cb) y a sus extremos células alfa (Ca) que, en conjunto, forman el divertículo. Hacia el centro se observa un pequeño lumen (L), así mismo se aprecian gránulos enzimáticos en color café (flechas). B) Cuatro grupos de células beta en forma de abanico cerrado a cuyos lados se desarrollarán células alfa, características de un divertículo joven. C) Divertículo en crecimiento. Izquierda en color morado las células beta, hacia la derecha se observan las células alfa, con varias vacuolas en su interior. D) Divertículos maduros fusionados, como resultado de la fusión se aprecia un aumento en el lumen (flecha).E) Estructura poligonal característica de la glándula digestiva, formada por divertículos digestivos. F) Células seroides (Cs), localizadas entre divertículos digestivos.

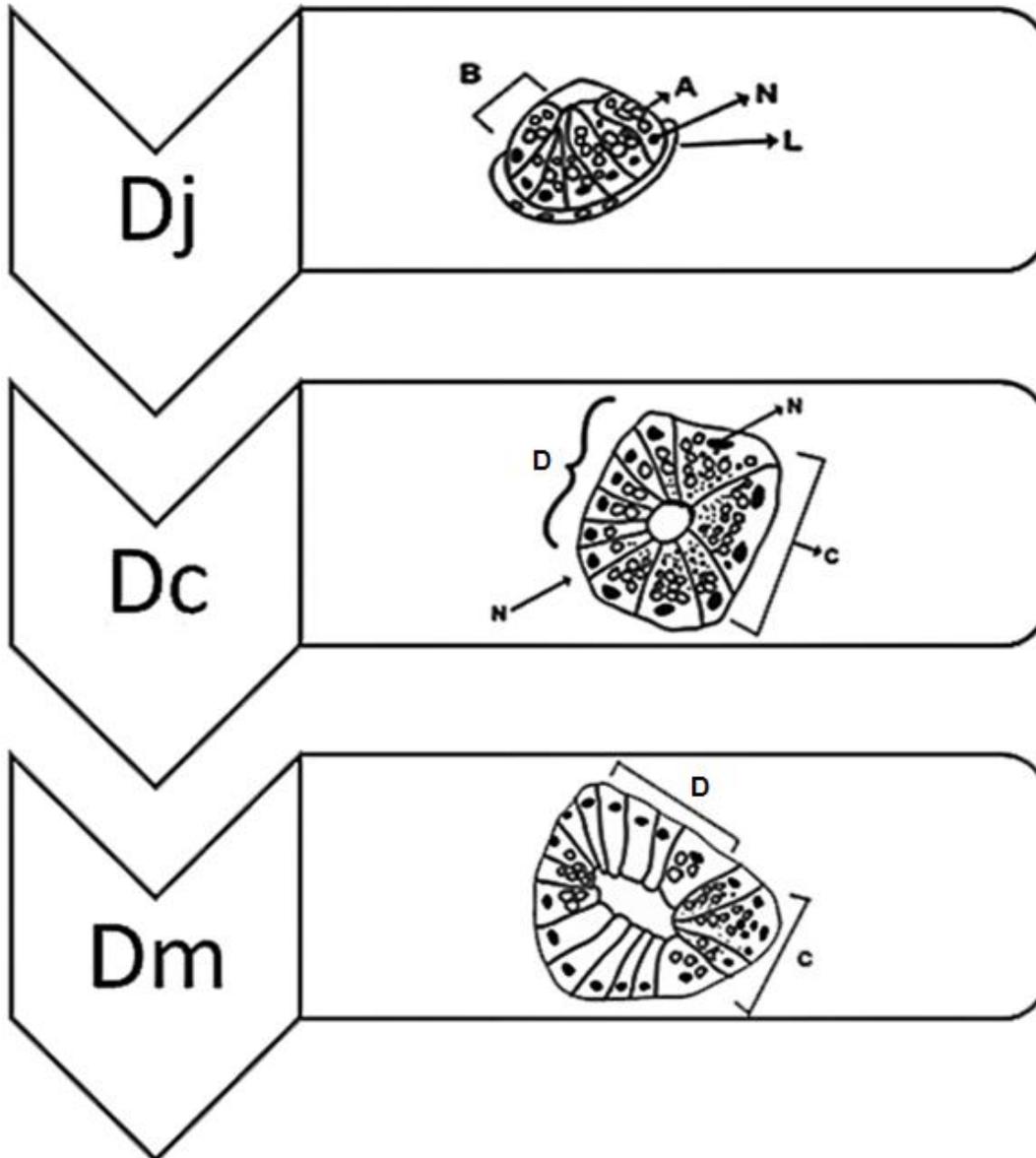


Figura 16. Esquema de cambios observados en los divertículos digestivos en organismos sin la presencia de la bacteria. Dj, divertículo joven. Dc, divertículo en crecimiento. Dm, divertículo maduro. B, célula críptica. D, células del ducto. A, gránulos enzimáticos. N, núcleo. L, lámina basal. d, células beta. C, células alfa con gránulos.

5.5 Alteraciones celulares y tisulares en la glándula digestiva

A partir de la descripción anterior, y considerando el número total de inclusiones de *Candidatus X. californiensis*, fue posible establecer la siguiente escala de intensidad de infección.

5.5.1 Grado 1, intensidad leve

De 1 a 500 inclusiones por organismo los daños celulares y tisulares son leves. Las alteraciones a nivel celular se limitan a la compresión del núcleo de la célula hospedera y a un aumento de tamaño de la misma, a esta alteración se le denomina hipertrofia, y va en aumento conforme crece la colonia de bacterias dentro de la vacuola citoplasmática que se ve rodeada por un halo (Fig. 17B). Las células adyacentes también pueden verse comprimidas. A nivel tisular los túbulos formados por células cilíndricas son uniformes, y los núcleos se disponen en la zona basal; la disposición de los divertículos es normal, la estructura es típicamente poligonal (Fig. 18B).

En La figura 19B se muestran epitelios con grado 1, hay escasas inclusiones en la glándula digestiva y se distribuyen focalmente, los divertículos están dilatados con apariencia normal, presentan células cripticas bien definidas y las células del ducto forman un epitelio rectangular y elevado. Los divertículos pueden fusionarse aumentando el diámetro del lumen. La transición del divertículo al túbulo continúa normalmente. Las células adyacentes también pueden verse comprimidas y se aprecia una proliferación celular que aparenta desplazar y reemplazar a las células infectadas (Fig 19A).

5.5.2 Grado 2, intensidad media

De 501 a 1000, inclusiones por organismo. Esta etapa se caracteriza porque las lesiones son focales. Aumenta el número de células infectadas, la hipertrofia celular tiende a incrementar así como el número de focos de infección. Se puede observar un incremento en el número de células desde la parte basal hacia la apical dando una apariencia estratificada del epitelio, lo que se define como hiperplasia (Fig. 17C). La hiperplasia ocurre de manera no uniforme dando una apariencia de hendiduras del epitelio, esta puede combinarse con hipertrofia y culminar con el desprendimiento de células infectadas (exfoliación). En otras ocasiones se observa un desprendimiento de fracciones de tejido incluyendo la membrana basal; mostrando un daño severo (Fig.

17D). Como en el grado 1, la transición de divertículo a túbulo no se ve afectada, aunque existan zonas lesionadas (Fig.18B). La morfología de la mayoría de los divertículos mantiene una apariencia normal.

En ocasiones, en las zonas con mayor acumulo de inclusiones se observa que hay un desorden en el desarrollo de las células del epitelio y de los divertículos lo que culmina en deformaciones, a este tipo de alteraciones se les conoce como displasias, en la figura 17D, se aprecia dicho cambio, en el cual las células comienzan a perder la forma típica y forman círculos de epitelio digestivo.

En las figuras 18C y 18D se aprecia un cambio dramático por el aumento de hipertrofia e hiperplasia en la zona infectada, sin embargo es un cambio focal.

Las zonas de transición no son afectadas aunque se aprecie ruptura del epitelio infectado (Fig.19C).

5.5.3 Grado 3, intensidad, severa

Más de 1001 inclusiones. Esta etapa se caracteriza porque las lesiones son generalizadas y la glándula digestiva se ve severamente afectada. Las células infectadas presentan una gran hipertrofia, en algunas de ellas, las colonias dentro de las vacuolas se observan en división. La gran cantidad de inclusiones de *Candidatus Xenohalotia californiensis* ocasiona un crecimiento desmesurado del epitelio (hiperplasias), que se pueden apreciar por la presencia de capas de celulares que se forman en la parte basal del epitelio, mismas que son abundantes. La hipertrofia e hiperplasia son generalizadas con múltiples zonas de desprendimiento celular y tisular (Figura 17E). (Figura 17F y 19D).

Se observan displasias en diferentes etapas de transformación. Esto conlleva a la pérdida de la forma rectangular típica del epitelio digestivo.

En algunas zonas del tejido afectado se aprecia un cambio en las células maduras de los divertículos digestivos de cilíndricas tubulares a cuboidales (metaplasia). Hay una marcada disminución en el número de divertículos jóvenes y en su lugar se observa tejido conectivo. Los divertículos que predominan se observan dilatados, con bordes irregulares, crecimientos celulares anormales y sin presencia de células cripticas, la forma típica poligonal de la glándula digestiva se pierde (Fig. 18F.). Ya no se aprecian con claridad las transiciones de divertículos digestivos a túbulos ya que todo el tejido se ha dañado (Fig. 19D).

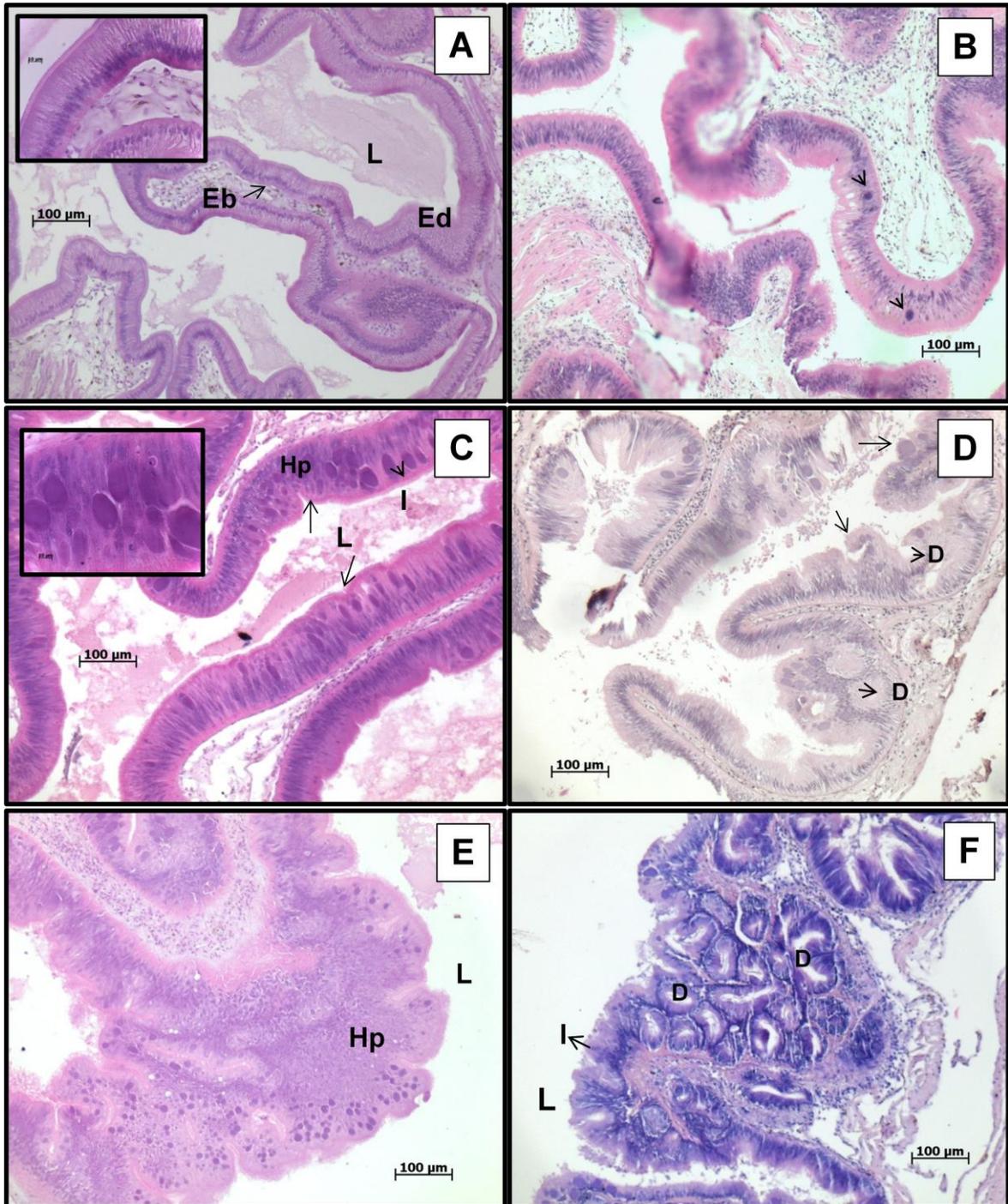


Figura 17. A) Epitelio digestivo de abulón sano, en la base del epitelio los núcleos que tiñen basófilos y hacia la parte distal se observan los cilios, el epitelio es uniforme (recuadro), (Eb) epitelio basal. (Ed) epitelio digestivo. B) Epitelio digestivo, con infección leve, las inclusiones no causan cambios, C) Epitelio con infección media, hacia la parte distal de las células se observan las inclusiones de *Candidatus Xenohalotus californiensis* que causan compresión entre células (recuadro). En el epitelio se observan diferentes grados de hiperplasia (Hp) y pequeñas ondulaciones (flechas) inclusiones, D) Epitelio con infección media, los focos de inclusiones en el epitelio provocan displasias (D), algunas zonas presentan ruptura del epitelio y liberación de células con inclusiones (flechas). E) Epitelio con infección severa, la presencia de inclusiones causa hipertrofia e hiperplasia total de epitelio. F) Epitelio con infección severa, la superficie está cubierta por displasias.

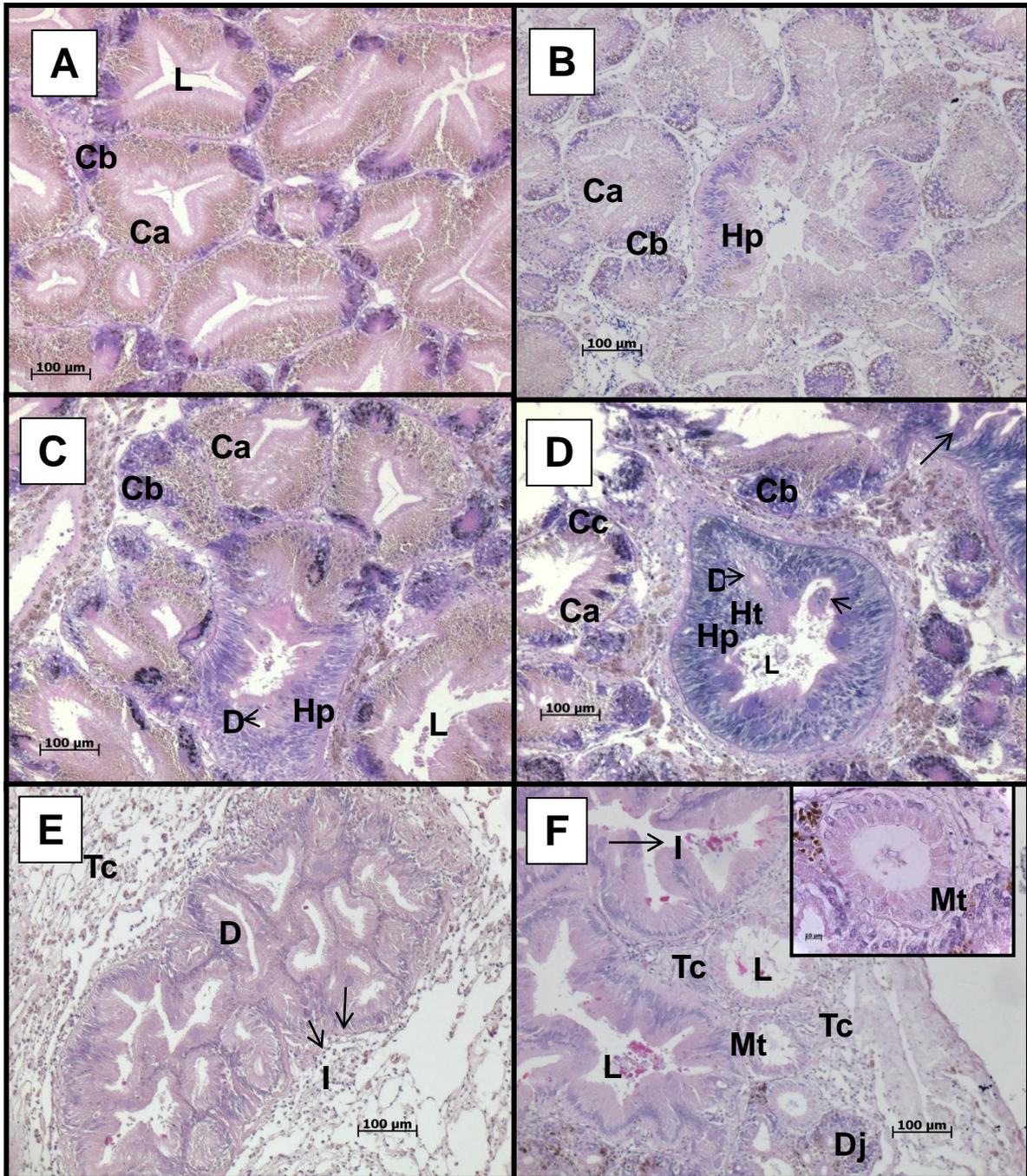


Figura 18. Glándula digestiva de abulón. A) Glándula digestiva en organismo sano, los divertículos digestivos presentan células beta (Cb) y alfa (Ca) características y la apariencia general es saludable. B) Glándula digestiva con infección leve, se observa una lesión focal, al centro divertículo digestivo con hiperplasia (Hp) parcial del epitelio. Al alrededor los divertículos conservan su apariencia normal. C) Glándula digestiva con infección media, el divertículo digestivo se observa con hiperplasia y displasia (Ds). D) Glándula digestiva con infección media. En el centro se muestra un divertículo digestivo con hipertrofia (Ht), hiperplasia, displasia y ruptura del epitelio (flecha). E) Glándula digestiva con infección severa, en el centro divertículo con displasia, rodeándolo tejido conectivo (Tc) y ocupando el lugar de los divertículos. Algunas inclusiones en el epitelio se señalan con flechas F) Glándula digestiva con infección severa, la forma típica de los divertículos se pierde. El epitelio pierde la estructura rectangular, las células epiteliales de los divertículos se transforman de cilíndricos a cuboidales lo que se denomina metaplasia (Mt) (recuadro) y el tejido conectivo invade la zona afectada, los divertículos digestivos jóvenes pierden su carga enzimática (Dj).

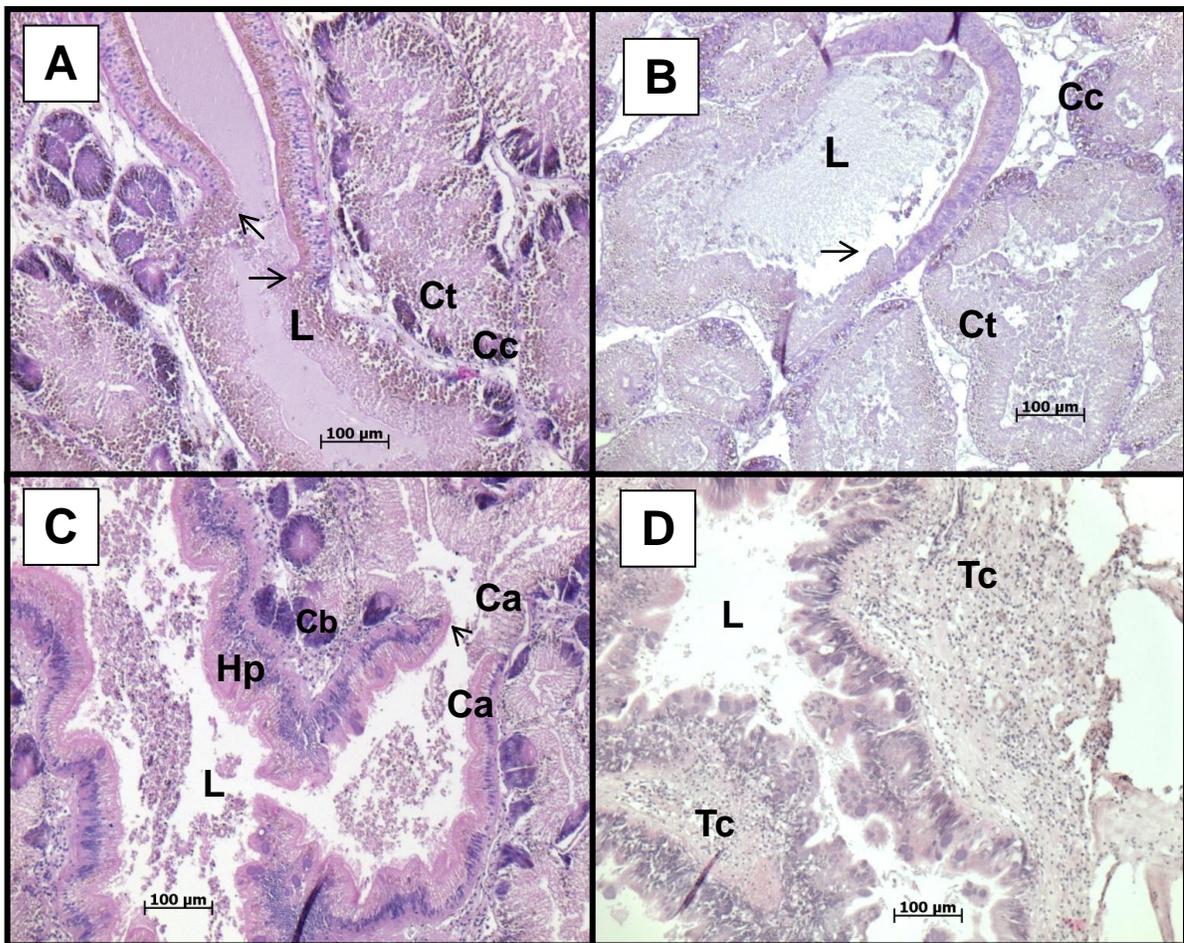


Figura 19. Zonas de transición de divertículo digestivo a túbulo, de la glándula digestiva. A) Transición en organismo sin infección, la zona de transición es señalada por flechas. B) Transición en organismo con infección leve, el cambio sigue un curso normal, aun que con inclusiones de la bacteria (flechas). C) Transición en organismo con infección media, el epitelio con inclusiones cambia, presenta hiperplasia (Hp) y el desprendimiento de células, aunque la transición sigue normalmente (flechas). D) Transición en organismo con infección severa, la transición no se observa con claridad, la destrucción del epitelio es generalizada y el tejido conectivo domina en la superficie.

Capítulo 6. Discusión

6.1 Discusión

La bacteria *Candidatus X. californiensis* se encuentra ampliamente distribuida en las zonas de captura de abulón en México, lo cual representa un aumento en el rango de distribución de esta rickettsia respecto a los estudios puntuales o a menor escala geográfica de Valles-Ríos (2000) y Álvarez-Tinajero *et al.* (2002) y corrobora los resultados de Cruz-Flores (2013). Aunque se observaron diferencias en los valores de prevalencia e intensidad entre las zonas y fechas de muestreo, éstas son difíciles de explicar por las diferencias en los tamaños de muestra disponibles. Para una comparación detallada es necesario un muestreo a mayor escala temporal y espacial, sin embargo los enormes costos que conlleva lo hacen limitante. Pese a ello, con los muestreos puntuales llevados a cabo se observó concordancia con estudios previos donde se observa que la prevalencia de *Candidatus X. californiensis* resulta ser mayor en abulón azul respecto a el amarillo, esto pudiera representar diferencias en la susceptibilidad entre estas dos especies. Por otra parte, la susceptibilidad diferencia entre especies podría estar asociada con la distribución batimétrica de *H. fulgens* y *H. corrugata*. De acuerdo con Cox (1962) el abulón azul se distribuye preferencialmente a profundidades de 3 a 6 m mientras que el abulón amarillo se distribuye a profundidades de 6 a 24 m. En abulón negro y rojo, la infección por *Candidatus X. californiensis* y el desarrollo del SD han sido asociados con aumentos de temperatura, menor disponibilidad de alimento y el estrés asociado a estos cambios (Vilchis *et al.*, 2005 y Moore *et al.*, 2009). En este sentido es posible suponer que el nicho ecológico del abulón amarillo podría jugar un papel importante en la distribución de esta enfermedad. Sin embargo, los datos de la pesquería nos muestran que la densidad poblacional de abulón amarillo es mucho menor que la del abulón azul, ¿ésta diferencia en densidad es el resultado del esfuerzo pesquero y la profundidad a que se distribuye esta especie?, ¿es una población que en términos de competencia inter-específica es más débil aunque más resistente al SD? Como se puede observar no hay una explicación simple a estas diferencias en prevalencias de infección entre especies, pero sí numerosas preguntas que deberán ser abordadas en el futuro. Si tomamos en

consideración la intensidad de infección entre estas dos especies vemos que no hay una clara diferencia, lo que sugiere que una vez que un abulón de estas especies es infectado por *Candidatus X. californiensis* el desarrollo de la infección parece seguir un mismo patrón; sin embargo, esto habría que demostrarlo vía estudios de laboratorio con infecciones simultáneas a mediano y largo plazo. Respecto a la posible asociación entre el sexo y la prevalencia de la infección no se observó un patrón diferencial; sin embargo, para ambas especies, los mayores grados de intensidad de infección se observaron en abulones hembras y organismos indiferenciados. Es claro que animales con intensidades severas de infección podrían verse afectados en su desarrollo gonadal, los estudios de Haaker *et al.* (1992) indican que *Candidatus X. californiensis* afecta el desarrollo gonadal por la imposibilidad del organismo afectado en canalizar energía para el mismo.

Los registros de prevalencia tan elevados (de 43% a 100% para el abulón azul y de 61% a 74% para el abulón amarillo) encontrados desde los años 90s por Álvarez-Tinajero, *et al* (2002), Cruz-Flores (2013) y los del presente estudio, sugieren una intensa interacción parásito-hospedero de largo plazo que, teóricamente, debería tender a una estabilización con episodios de desequilibrio temporales. Si consideramos que los niveles de intensidad en organismos de unos 10 o 15 años de edad (Gluyas-Millán, 2003) son por lo general leves, la descripción tisular de la progresión de la infección en la glándula digestiva de la cual se hablará más adelante, podemos afirmar que se trata de una enfermedad, crónica y endémica, tal como lo ha sugerido Moore *et al.* (2002) y Friedman, *et al* (2014). Esto implica que, como en cualquier enfermedad endémica hay una tasa de morbilidad. Si consideramos que en el grado de infección ligero, no hay evidencias de desarrollo de la enfermedad más sí de infección, podemos decir que hay un alto porcentaje de abulones infectados (>80% de la población estudiada con grado 1 de intensidad) más no enfermos. Eventualmente se desencadenará el desarrollo de la enfermedad por algún disparador externo (posiblemente, temperaturas, escases de alimento, estrés, etc.) pero ésta será de evolución lenta al ser de carácter crónico y se reflejará en ocurrencia de mortalidades a largo plazo. Los organismos que pudieran ser considerados en las estimaciones de morbilidad serían aquellos con grados de intensidad 2 y 3, los de grado dos ya estarían en pleno desarrollo de la enfermedad pero aún pasaría mucho tiempo para que eventualmente murieran. Por su parte, los

animales con grado 3 de intensidad de infección, son los que, en teoría, estarían condenados a morir en un menor plazo, en especial si ocurriesen factores estresantes externos y desde luego podrían ser los mejores indicadores de los niveles de morbilidad, que, por tanto serían relativamente bajos. A un nivel poblacional en condiciones naturales sin presión pesquera, teóricamente este tipo de enfermedades endémicas y crónicas deberían ser un factor de regulación de densidad natural sin que pusiera en peligro la subsistencia de las poblaciones del hospedero; sin embargo, en una situación de elevadísima presión pesquera, la capacidad de respuesta poblacional a este tipo de fenómenos naturales (resiliencia) puede verse comprometida y sumarse a los factores que han propiciado las disminuciones de abulón en la zona.

Por otro lado, la discrepancia entre valores de intensidad de infección elevados y ausencia de signos claros del SD a nivel externo, quizás esté relacionada con las características inherentes a la progresión de la infección y los mecanismos fisiológicos de compensación del hospedero que sigue siendo capaz de sobrevivir sin necesariamente mostrar evidencias externas de la enfermedad. Situaciones análogas las podemos observar en enfermedades crónicas en otros grupos de animales y seres humanos, por ejemplo en la cirrosis hepática que es una enfermedad crónica en humanos pueden empeorar lentamente durante meses o años y es posible que no se note ningún síntoma durante algún tiempo. La pérdida de la función puede ser tan lenta que no se presentan síntomas hasta que el hígado casi ha dejado de funcionar (Bustíos *et al.*, 2007). Contrariamente, animales con signos externos del SD pueden no ser siquiera portadores de la rickettsia o tener un nivel de infección ligero, esto puede ser debido a que los signos de SD no deben ser considerados patognomónicos, sino simplemente indicadores de inanición, estrés o presencia de cualquier otra enfermedad o alteración fisiológica, por lo menos en las especies estudiadas. Es claro que no todos los individuos de una misma población responden igual ante una enfermedad, y esto está determinado por factores genéticos, fisiológicos, etc., aún más la respuesta ante una misma enfermedad entre especies diferentes, desde luego es distinta, esto ayudaría a explicar las diferencias que se han encontrado en este estudio con respecto a la asociación directa de los signos externos de SD y la rickettsiosis descrita en Estados Unidos para el abulón negro y rojo (Friedman *et al.*, 1997 y Braid *et al.*, 2005)

Si bien la presencia de la procariota provoca cambios en el epitelio digestivo. Fue necesario realizar un análisis de la estructura normal para obtener un punto de comparación, pues hasta la fecha no se contaba con una referencia que permita diferenciar una patología de una condición normal de la glándula digestiva del abulón. Ya que las descripciones del curso de las lesiones observadas por la presencia de la bacteria no coinciden plenamente con los descritos por Gardner *et al.* (1995), ni por los observados por González *et al.* (2012). En el primer caso lo que se describe como una metaplasia no es más que la transición normal del epitelio de divertículo a túbulo y en el segundo, lo que se describe como sustitución de divertículos por túbulos digestivos es la disminución en el número de divertículos que son substituidos por tejido conectivo fibroso.

En el presente estudio se describieron los cambios en animales libres de *Candidatus X. californiensis*, mismos que coinciden con etapas normales de la digestión y absorción propios de la actividad digestiva de la almeja *Lasaea rubra* (Morton, 1956); además, las células de la glándula digestiva son morfológicamente similares a los tipos celulares descritos en el hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri* que posee células embrionarias en los divertículos jóvenes muy similares a las encontradas en este estudio. Otro cambio normal es el aumento en la luz de los divertículos, cuya apertura es necesaria en el langostino para mejorar el drenado de secreciones enzimáticas producidas por el hepatopáncreas (Cuartas *et al.*, 2002). La ocurrencia de cambios similares en abulones libres de *Candidatus X. californiensis*, permitieron diferenciarlos de aquellos que coinciden como perturbaciones en el desarrollo celular (Mumford *et al.*, 2007). Los cambios adaptativos por parte de las células y tejidos ante una infección pueden resultar en su recuperación o degeneración. La hipertrofia de las células hospederas está asociada a un incremento de la demanda de trabajo, a la irritación o a dilatación por la presencia de un agente extraño (Mumford *et al.*, 2007). Este cambio puede revertirse si la célula logra neutralizar al agente extraño. Cuando además de la hipertrofia se presenta una hiperplasia que refleja la proliferación celular para contener al agente extraño, se puede hablar de una adaptación del epitelio ante el agente extraño (Mumford *et al.*, 2007). El aumento en el número de células indica un incremento en la demanda funcional de las mismas (Mumford *et al.*, 2007), este tipo de cambios celulares coincidieron con el incremento en el número de inclusiones

rickettsiales en el epitelio. Si estos cambios adaptativos no son exitosos, pueden derivar en alteraciones del crecimiento celular y formas celulares atípicas que se conocen como displasias. Cuando ocurren, se asocian con la pérdida de la polaridad del crecimiento celular y tisular mismo, que provoca uniones del epitelio formando circunferencias en las cuales las partes de absorción del epitelio quedan encerradas, evitando que los nutrientes sean utilizados por las células. Este cambio, teóricamente, puede ser reversible dependiendo de lo extenso del mismo. Otro de los cambios celulares observados en animales con un alto número de rickettsias fue la metaplasia de los divertículos digestivos, cambio que se asocia con la sustitución de un epitelio maduro por otro tipo celular; en este caso, se observó claramente el cambio del epitelio cilíndrico por células cubicas. Este tipo de cambio está asociado con anomalías nutricionales y a un constante proceso de irritación. Esto también coincide con la constante sustitución del epitelio por la presencia de las inclusiones. Aparentemente los divertículos que logran permanecer, tienen que agotar todas sus reservas enzimáticas, razón por la cual no se aprecian células de la cripta en los divertículos con metaplasia.

A este nivel de daño celular y tisular, los divertículos mueren y los espacios son ocupados por tejido conectivo que forma fibrosis en la glándula digestiva. El daño que se observa en el grado 3 de intensidad de infección no parece ser reversible, en este sentido, estudios de uso de oxitetraciclina y otros antibióticos para tratar abulón negro y rojo infectados por *Candidatus X. californiensis* (Friedman *et al.*, 2003) han demostrado que animales severamente afectados no son capaces de recuperarse después del tratamiento.

Las descripciones anteriores del tejido en organismos sin infección y con ella, podrían contribuir a comprender mejor la evolución de la enfermedad y los mecanismo de defensa de los animales infectados por *Candidatus X. californiensis*, así como la respuesta que tendría la población ante la presencia de bacteria.

Tanto los resultados de prevalencia e intensidad como las observaciones de los daños asociados con la presencia de *Candidatus X. californiensis* demuestran que esta se trata de un agente patógeno endémico y que la enfermedad que provoca es de carácter crónico (lenta evolución) lo que sugiere que difícilmente puede ser considerado el

agente causal de mortalidades masivas puntuales; más bien estas, estarían asociadas con alteraciones ambientales extremas que afectan a toda la población, ya se infectada o no por la rickettsia, en este escenario, es claro que los abulones con intensidad de infección severo (grado 3), serían los más vulnerables ante estos cambios extremos. El estudio de las causas de disminución en las poblaciones de abulón en la zona debe ser abordado en términos holísticos, entre los cuales la presión pesquera merece atención especial, y considerando la capacidad de resiliencia de las poblaciones de abulón. Por lo cual se recomienda hacer un análisis permanente de *Candidatus X. californiensis* de la zona de captura con objeto de conocer mejor la epizootiología de esta enfermedad y dimensionar su efecto en la población. Así mismo, se recomienda realizar un estudio a nivel de laboratorio que permita definir con mayor claridad la patogénesis de la enfermedad y su relación con la apariencia externa de los abulones enfermos.

Capítulo 7. Conclusiones

7.1 Conclusiones

En este proyecto de tesis se demostró que *Candidatus X. californiensis*, se encuentra en los epitelios digestivos de abulón azul y amarillo, las inclusiones bacterianas se observaron mediante la técnica histológica y su identidad se confirmó mediante la técnica de PCR. La bacteria se identificó en organismos de las diferentes cooperativas analizadas, lo cual indica que está ampliamente distribuida en la zona de captura comercial en México. También se observó que la prevalencia en los organismos de la zona es mayor al 60%, aun que en abulón azul fue mayor la prevalencia, es necesario identificar los factores que influyen en dicho resultado. En cuanto a la prevalencia entre sexos no se identificó asociación a esta característica, lo cual indica que la bacteria se encuentra de manera general en la población, por lo cual debe ser catalogada como endémica en la península de Baja California.

Por otro lado, se propuso una nueva escala de grados de intensidad, que están más próximos a las necesidades cualitativas observadas en los cambios morfológicos, causados por la presencia de *Candidatus X. californiensis* de las especies analizadas. La escala propuesta ayudará a identificar el progreso de la infección de las poblaciones. Se observó que los organismos de abulón azul y amarillo se encuentran en gran parte dentro del primer grado, donde la infección es leve. Y las infecciones moderadas a graves son un reflejo de la cronicidad de la enfermedad y la capacidad de respuesta de los epitelios.

Para lograr la descripción de las lesiones fue necesario realizar una descripción previa de la anatomía y morfología de los túbulos y de los divertículos localizados en la glándula digestiva de abulón azul y amarillo, estas células no estaban descritas claramente en estas especies, aun que presentaron similitud con otros moluscos y crustáceos. Las descripciones fueron indispensables para comprender el comportamiento de los epitelios ante la infección de *Candidatus X. californiensis*, así

como para la caracterización y la diferenciación de los cambios tisulares normales, de alteraciones patológicas.

Ya que el daño tisular provocado por la bacteria está asociado a la intensidad y respuesta de regeneración celular de los epitelios digestivos y de la glándula digestiva. La respuesta a la infección parece ser lenta y progresiva, lo cual indica que la enfermedad es de carácter crónico, aun que en los organismos analizados no se observaron los signos externos descritos para SD, lo cual indica que en las especies analizadas, no deben ser considerados signos patognomónicos para *Candidatus X. californiensis*.

De acuerdo a los resultados obtenidos *Candidatus X. californiensis* se considera una bacteria de carácter endémico que causa cuadros de curso crónico y difícilmente puede ser considerada como agente causal de mortalidades masivas puntuales en la zona.

7.2 Recomendaciones

Los resultados obtenidos muestran las condiciones en las que se encuentra la zona en la temporada analizada, sin embargo para mantener esta información actualizada y se puedan tomar decisiones posteriores, se recomienda mantener una vigilancia epidemiológica constante. Así como realizar observaciones y evaluaciones del comportamiento de la bacteria en todas las etapas de crecimiento del abulón, para identificar los puntos críticos en donde estos organismo puedan ser más susceptibles al contagio y al desarrollo de la enfermedad.

Sin embargo se sabe que el alto valor de este producto puede ser un factor que impida el constante monitoreo, ya que puede representar grandes pérdidas económicas para la industria pesquera. Por lo tanto se recomienda desarrollar una técnica de biopsia para la obtención de muestras no invasivas, con la que se podría lograr un análisis constante del progreso de la infección hasta el desarrollo de la enfermedad.

También se recomienda observar la glándula digestiva en diferentes procesos digestivos, mediante histología e histoquímica. Para identificar el tipo de células presentes en los dichos procesos y las enzimas que se producen. Estas observaciones auxiliarían a la identificación de los tipos celulares que interfieren en las funciones inmunológicas del epitelio digestivo.

Referencias bibliográficas

- Álvarez Tinajero, M. D. C. (2000). Simbiontes de los abulones amarillo (*Haliotis corrugata*) y azul (*haliotis fulgens*) de Isla de Cedros e Islas San Benito, Baja California, México. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 107 p.
- Álvarez-Tinajero, M.D.C., Cáceres-Martínez, J and Gonzáles Avilés, J. G. (2002). Histopathological evaluation of the yellow abalone, *Haliotis corrugata* and the abalone *Haliotis fulgens* from Baja California, México. *Journal of Shellfish Research*. 21(2), 825-830.
- Andree, K.B., Friedman, C.S., Moore, J.D and Hendrick, R.P. (2000). A polymerase chain reaction assay for the detection of genomic DNA of a Rickettsiales-like prokaryote associated with withering syndrome in California abalone. *Journal Shellfish Research* 19(1), 213-218.
- Bevelander, G. (1988) *Abalone Gross and Fine Structure*. Pacific Grove, CA: The Boxwood Press. 422 pp.
- Braid, B. A., Moore, J. D., Robbins, T. T., Hedrick, R. P., Tjeerdema, R. S and Friedman, C. S. (2005). Health and survival of red abalone, *Haliotis rufescens*, under varying temperature, food supply, and exposure to the agent of withering syndrome. *Journal of invertebrate pathology*, 89(3), 219–231.
- Bustíos Sánchez, C., Díaz Ferrer, J., Román Vargas, R., Dávalos Moscol, M y Zumaeta Villena, E. (2009). Características Clínico-Epidemiológicas del Carcinoma Hepatocelular y su tratamiento en el departamento del aparato digestivo del HNERM ES-SALUD. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 29(1), 17-23.
- Cáceres-Martínez, J., and Tinoco-Orta, G. D. (2001). Symbionts of cultured red abalone *Haliotis rufescens* from Baja California, México. *Journal of Shellfish Research* 20(2), 875-877.
- Cáceres-Martínez, J., (2002). Algunas enfermedades infecciosas en Moluscos. Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico, UAM-SAGARPA. 2(18),1-10.
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R. and Padilla Lardizábal, G. (2010). Parasites of the pleasuer oyster *Crassostrea corteziensis* cultured in Nayarit, México. *Journal Aquatic Animal Health*. 22(3), 141-151.
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R and Flores-Saaib, R. D. (2011). Intracellular prokaryote *Xenohaliotis californiensis* in abalone *Haliotis* spp. from Baja California, México. *Ciencia Pesquera*. 19(2), 5-11.
- Cariño, M. M. y Montefore, M. (SEMARNAT). (2008). *Del saqueo a la conservación: historia ambiental contemporánea de Baja California Sur, 1940-2003*.

Recuperado de: 13 de Mayo de 2013.
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/download/545.pdf>

Cox, K.W. (1962). California Abalones, family haliotidae. The resources agency of California department of fish and Game. Fish bulletin No. 1(1),8-133p.

Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. (1980-1989). Anuario. Recuperado el 01 de Mayo de 2013 de:
http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/1980_1989

Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. (1993). NOM-005-PESC-1993. Recuperado el 08 de Agosto de 2014 de:
<http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/work/sites/cona/resources/LocalContent/8739/21/005pesc1993ABULON.pdf>

Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. (1999-2000). Anuario. Recuperado el 01 de Mayo de 2013 de:
http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/1990_2000

Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. (1999-2000). Anuario. Recuperado el 01 de Mayo de 2013 de:
http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_%20de_pesca

Cuartas, E, I. Díaz, C. y Petriella A, M. (2002). Estudio morfológico e histológico del hepatopáncreas del langostino pleoticus *muelleri* (Bate) (Crustacea, Penaeoidea). *Revista Investigación Desarrollo Pesquero.*, 15, 5–13.

Cruz-Flores, R. (2013). Distribución, prevalencia e intensidad de *Xenohaliotis californiensis* parásito del abulón *Haliotis fulgens* y *Haliotis corrugata*, en la península de Baja California, México. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 80 p.

Esquivel-García, Z., Cáceres-Martínez, J. and Magallón-Montes, S. (2011). Oxytetracycline water bath treatment of juvenile blue abalone *Haliotis fulgens* (Philippi 1845) affected by withering syndrome. *Ciencias Marinas*, 37(2), 191–200.

FAO. (2012). El estado mundial de la pesca y acuicultura .Roma. 231 pp.

Fernández, D. A. R. and Sáenz-Arrollo, A. (2012). The Historical Ecology of Abalone (*Haliotis corrugata* and *fulgens Fulgens*) in the Mexican Pacific. *México y la Cuenca del Pacífico*, 89–112.

Friendman, C, S., Gardner, G, R., Hendrick, R, P., Stephenson, M., Cawthorn, R,J and Upton, S, J. (1995). *Pseudoklossia haliotis* sp.n. (*Apicoplexa*) from the Kidney of California Abalone, *Haliotis* spp. (*Mollusca*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 66 (1), 33–38.

- Friedman, C.S., Thomson, M., Chun, C., Haaker, R. L and Hedrick, R.P. (1997). Withering Syndrome of the black abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): Water temperature, food availability, and parasites as possible causes. *Journal Shellfish Research*. 16 (2), 403-411.
- Friedman, C.S., Andree K.B., Beauchamp, K.A., Moore, J.D, Robbins T.T., Jeffrey, D., Shields J.D and Hedrick, R. (2000). *Candidatus Xenohaliotis californiensis* a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast North America. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50(2), 847-851.
- Friedman C.S., Trevelyan G., Robbins, T. T., Mulder E.P and Fields R.(2003). Development of an oral administration of oxytetracycline to control losses due to withering syndrome in cultured red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture*. 224(1), 1-23.
- Friedman, C. S and Crosson, L.M. (2012). Putative Phage Hyperparasite in the Rickettsial Pathogen of Abalone, "*Candidatus Xenohaliotis californiensis*". *Microbial Ecology* 64(4), 1064-1072.
- Gardner, G. R., Harshbarger, J.C. Lake, J.L. Sawyer, T. K. Price, K.L., Stephenson, M.D., Haaker P.L .and Togstad, H.A. (1995). Association of Prokaryotes with Symptomatic Appearance of Withering Syndrome in Black Abalone, *Haliotis cracherodii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 66(2), 111-120.
- Geiger, D,L and Guido, T, P. (2007). *A Conchological Iconography*. ConchBooks. 121 pp.
- Gluyas-Millán, G. M., Talavera-Maya, J. (2003) Composición por tallas y edades de las poblaciones de abulón *Haliotis fulgens* y *Haliotis corrugata* de la zona de Bahía Tortugas, Baja California Sur, México. *Ciencias marinas*, 29(1), 89-101.
- González, R., Lohrmann, K. B., Pizarro, J and Brokordt, K. (2014). Differential susceptibility to the Withering Syndrome agent and renal coccidia in juvenile *Haliotis rufescens*, *Haliotis discus hannai* and the interspecific hybrid. *Journal of invertebrate pathology*, 116, 13–17.
- Guzmán del Prío, S.A. (1992). A review of the biology of abalone and its fishery in Mexico. In *Abalone of the world. Biology, fisheries and Culture*. (Ed. by Sheperd, Tegner M.J and Guzmán del Prío S.A). pp 341-360. *Fishing News Books*, Oxford.
- Haaker, L.P., Parker O.D. and Togstad H. Richards, D. V., Davis, G. E. and Friedman, C.S (1992). Mass Mortality and withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*, in California. In *Abalone of the world Biology, fisheries and Culture*. (Ed. by Sheperd, Tegner M.J and Guzmán del Prío S.A) pp 214-224. *Fishing News Books*, Oxford.

- Hahn, K.O. (1989). *Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods*. Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc. 348 pp.
- Howard, D.W. and Smith, C.S. (1993). Histological techniques for marine bivalve mollusks. NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25. US. Department of Commerce. Woods Hole, Massachusetts. p 97.
- Instituto Nacional de Pesca. Carta Nacional de Pesca. Recuperado 05 de Agosto de 2013 de:
<http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/CARTA%20NACIONAL%20PESQUERA/carta+nacional+pesquera+2000.pdf>
- Instituto Nacional de Pesca. Carta Nacional Pesquera. Recuperado 08 de Agosto de 2013 de:
<http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/CARTA%20NACIONAL%20PESQUERA/carta+nacional+pesquera+actualizacion+2004.pdf>
- Instituto Nacional de Pesca. Carta Nacional de Pesca. Recuperado 20 de Agosto de 2013 de:
<http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/cartaNacionalPesquera2010.pdf>
- Instituto Nacional de Pesca. Carta Nacional de Pesca. Recuperado 20 de Agosto de 2013 de:
<http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/CARTA%20NACIONAL%20PESQUERA/24082012%20SAGARPA.pdf>
- Instituto Nacional de Pesca. (2006). *Sustentabilidad y pesca responsable en México*. 543 pp.
- Ken-ichi-Yamamoto., Takeshi Handa and Masakazu Kondo. (2005). Structure of digestive diverticula of abalone, *Haliotis (Nordotis) discus discus*. *Journal of National Fisheries University*. 53.(3), 105-116.
- Lafferty, K. D and Kuris, A. M. (1993). Mass mortality of abalone *Haliotis cracherodii* on the California Channel Islands: tests of epidemiological hypotheses. *Marine Ecology Progress Series*, 96, 239–248.
- Leighton, D. L. (2000). *The biology and culture of the California Abalones*. Pittsburg, Pennsylvania Dorrance Publishing Co., INC. 216 pp.
- Lindberg, R. D. (1992). Evolution, distribution and systematic of Haliotidae. In. *Abalone of the world Biology, fisheries and Culture*. (Edit by Sheperd, Tegner M.J and Guzmán del Prío S.A) p 3-18. Fishing News Books.
- Martínez-Maeda, A, N. (2002). *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. México. Limusa. 501 pp.

- Moore, J.D., Robbins, T.T and Friedman, C.S. (2000). Withering Syndrome in Farmed Red Abalone, *Haliotis rufescens*: Thermal Induction and Association with a Gastrointestinal Rickettsiales-like Prokaryote. *Journal of Aquatic Animal Health* 12(1),26-34.
- Moore, J. D and Friedman, S, C. (2002). Withering syndrome and restoration of southern California abalone populations. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations*, 43, 112–117.
- Moore, J. D., Juhasz, C. I., Robbins, T. T., & Vilchis, L. I. (2009). Green abalone, *Haliotis fulgens* infected with the agent of withering syndrome do not express disease signs under a temperature regime permissive for red abalone, *Haliotis rufescens*. *Marine biology*, 156(11), 2325-2330.
- Morton, J.E. (1956). The tidal rhythm and action of the digestive system of the lamellibranch *Lasaea rubra*. *J.Mar. biol.Ass.U.K.* 35, 563-586.
- Mumford, S., Heidel, J., Smith, C., Morrison, J., Macconnell, B and Blazer, V. (2007). Fish histology and histopathology manual. *US Fish & Wildlife Service, National Conservation Training Center (USFWS-NCTC)*.
- Ponce-Díaz, G., y Lluch-Cota, S.E., Bautista-Romero, J.J. y Lluch-Belda, D. (2003). Caracterización multi-escala de la temperatura del mar en una zona de bancos de abulón (*Haliotis* spp .) en Bahía Asunción , Baja California Sur , México. *Ciencias Marinas*, 29(3), 291–303.
- Ponce-Díaz, G. Cadena (2003). Estudio de la cadena Productiva de Abulón. Recuperado el 23 de Septiembre de 2014 de: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_estudio_de_la_cadena_abulon
- Oceanografía de los mares de Mexicanos aplicación de la pesca y acuicultura. Recuperado el 12 de Abril de 2014. http://omm.cicese.mx/omm_01.htm
- OMS. Recuperado el 12 de agosto de 2014 de: http://www.who.int/topics/chronic_diseases/es/
- Steinbeck, J.R. (1992). Investigations into a mortality among populations of the California black abalone, *Haliotis cracherodii*, on the central coast of California, USA. In. *Abalone of the world Biology, fisheries and Culture*. (Ed. by Sheperd, Tegner M.J and Guzmán del Prío S.A) pp 203-213. Fishing News Books.
- Shaw, B.L. and Battle, H.I. 1957. The gross microscopic anatomy of the digestive gland of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology* 35(3), 325-346.
- Vilchis, L. I., Tegner, M. J., Moore, J.D., Friedman C.S. Riser, L. K. Robbins, T. T and Dayton, P.K. (2005). Ocean warming effects on growth, reproduction, and

survivorship of southern California abalone. *Ecological Applications*, 15(2), 469–480.

Anexo 1.

CICESE
ENVÍO DE MUESTRAS DE ABULÓN¶

NOMBRE DE LA COOPERATIVA: _____				
RECOLECTA DE EJEMPLARES				
NOMBRE DEL RESPONSABLE			CLAVE DE IDENTIFICACIÓN¶	
FECHA Y HORA DE RECOLECTA	ESPECIE DE ABULÓN ABULÓN AZUL---(-----)-----ABULÓN AMARILLO---(-----)		TALLA (cm)	
LOCALIDAD	BANCO	COORDENADAS (utm)		
DATOS AMBIENTALES¶				
TEMPERATURA¶	SALINIDAD¶	OXÍGENO¶		
TIPO DE FONDO¶		PROFUNDIDAD¶		
OBSERVACIONES DE LOS EJEMPLARES¶				
SEXO DEL ABULÓN¶				
MADUREZ¶	DESOVADO¶	INICIO¶	MEDIO¶	MADURO¶
TAMAÑO DEL CALLO¶	GRANDE¶	MEDIANO¶	CHICO¶	MUY CHICO¶
COLORACIÓN¶	NORMAL¶	DESCOLORIDO¶	MUY DESCOLORIDO¶	TRANSPARENTE¶
DUREZA DEL CALLO¶	DURO¶	MEDIANAMENTE DURO¶	AGUADO¶	MUY AGUADO¶
MOVILIDAD¶	MUY ACTIVO¶	ACTIVO¶	LENTO¶	INMÓVIL¶
OLOR¶	NORMAL¶	FÉTIDO¶	MUY FÉTIDO¶	OTRO¶
DESCONCHADO¶	NORMAL¶	FÁCIL¶	MUY FÁCIL¶	DESPRENDIDO¶
OTRAS CARACTERÍSTICAS DEL CALLO¶	CON CAVERNAS---(---)¶	SIN AMPOLLAS---(---)¶	CON MANCHAS---(---)¶	
	SIN CAVERNAS---(---)¶	CON GRANOS---(---)¶	SIN MANCHAS---(---)¶	
FOTOGRAFÍA¶	SÍ	NO	CLAVE DE LA FOTOGRAFÍA¶	
OTRAS OBSERVACIONES¶				

Anexo 2.**Solución fijadora Davison Para preparar 20L**

Glicerina.....	2L
Formol.....	4L
Alcohol 96%.....	6L
Agua de mar filtrada.....	6L
Ácido acético.....	2L

Anexo 3.

Protocolo de deshidratación histoquinet

Duración 19 horas de 70% ETOH para secciones de moluscos o tejido de peces de 5 mm de grosor.

80% ETOH.....	1h
95% ETOH.....	2h
95% ETOH.....	2h
100% ETOH.....	2h
100% ETOH.....	2h
100% ETOH.....	1h
Xileno.....	1h
Xileno.....	2h
Parafina.....	2h
Parafina.....	2h
Parafina.....	2h

Anexo 4.

Extracción de ADN con el kit DNEASY BLOOD AND TISSUE de QIAGEN

1.-Cortar e tejido (~25mg) en pequeños pedazos y colocar en un tubo eppendorf de 1.5ml. (*en el laboratorio se molió el tejido en un mortero de porcelana). Añadir 180µl de Buffer ATL, 20 µl de Proteinasa K y mezclar mediante vórtex. Incubar a 56°C hasta que termine la lisis; en el caso de tejido de abulón alrededor de 2 h. Mezclar cada 15 minutos con vórtex.

2.-Añadir 200 µl de Buffer AL. Mezclar mediante vórtex.

3.- Agregar 200 µl de etanol al 96-100%. Mezclar mediante vórtex.

4.-Pipetear la mezcla en una columna DNeasy Mini spin columna situada en un tubo de colecta de 2 ml. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Descartar el tubo de colecta con el líquido colectado.

5.- Colocar la columna en nuevo tubo de colecta de 2ml. Agregar 500 µl de Buffer AW1. Centrifugar por 1 minutos a 8000 rpm. Descartar el tubo de colecta y el líquido recuperado.

6.- Colocar la columna en un nuevo tubo de colecta de 2ml. Agregar 500 µl de Buffer AW2 y centrifugar por 3 minutos a 14,000 rpm. Descartar el tubo de colecta y el líquido recuperado.

7.- Transferir la columna a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml. Eluir el ADN añadiendo 200 µl de Buffer AE al centro de la membrana de la columna. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (15-25°C). Centrifugar a 8,000 rpm durante 1 minuto.

8.- Para incrementar la concentración de ADN, repetir el paso 7.

Anexo 5.

Purificación de de productos de PCR con membrana de sílica

1. Adicione 500µL de Buffer PBI por cada 100 µl e PCR, mezcle con vórtex ligero. Verifique que el color de la mezcla tome un color amarillo, si la coloración es naranja o violeta, adicione 10 µL de acetato de sodio 3M, pH 5 (ésteril)³. Para capturar el ADN de interés, aplique la muestra en la columna ya preparada.³. Centrifuge por 1 min (10,000 rpm).
2. Descarte el eluído por decantación y coloque de nuevo la columna en el mismo tubo.
3. Lave la columna adicionando 750 µL de Buffer PE y centrifuge por 1 min (10,600 rpm).
4. Descarte el eluído por decantación y coloque de nuevo la columna en el mismo tubo.
5. Centrifuge de nuevo (10,600 rpm) por 1 min. Y descarte el líquido sobrenadante.
6. Coloque la columna en un tubo estéril de 1.5 mL.
7. Para eluir el ADN adicione 50 µL de Buffer EB (TrisCl 10 mM, pH 8.5) o agua esteril en el centro de la membrana y centrifuge por 1 min (10,600 rpm).
8. Adicione nuevamente 30µL de buffer EB y deje reposar por 15 min.
9. Centrifuge por 1 min (10,600 rpm).
10. El volumen aproximado del eluído es de 76 µL.
- 11.14. Detecte por electroforesis en agarosa y almacene el ADN a -20°C.

Referencia: Manual del fabricante QIAquick PCR Purification Kit. Quiagen 2006