

Tesis defendida por
Luis Miguel Molina Carrillo
y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla
Codirector

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Codirector

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez
Miembro del Comité

Dr. Axayácatl Rocha Olivares
Miembro del Comité

Dra. Rebeca Vásquez Yeomans
Miembro del Comité

Dr. Beatriz Cordero Esquivel
Coordinador
Programa de Posgrado en Ciencias
en Acuicultura

Dr. Jesús Favela Vara
Encargado del despacho de la
Dirección de Estudios de Posgrado

Noviembre de 2013

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE
ENSENADA



Programa de posgrado en Ciencias
en Acuicultura

Expresión de genes inmunorrelacionados y de estrés térmico en abulón rojo, *Haliotis rufescens*, sintomático al síndrome de deshidratación

Tesis

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

Presenta:

Luis Miguel Molina Carrillo

Ensenada, Baja California, México

2013

Resumen de la tesis de Luis Miguel Molina Carrillo, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura

Expresión de genes inmunorrelacionados y de estrés térmico en abulón rojo, *Haliotis rufescens*, sintomático al síndrome de deshidratación

Resumen aprobado por:

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

Resumen

El síndrome de deshidratación (SD) es una enfermedad crónica causada por *Xenohaliotis californiensis*, un procariota del orden Rickettsiales (PTR), que afecta a diversas especies de abulón. La enfermedad está acompañada de una serie de cambios fisiológicos que involucran los mecanismos de defensa del hospedero. Los mecanismos de defensa del huésped a nivel molecular dependen de la expresión de genes específicos asociados a su vez con la producción de ciertas proteínas en cantidades apropiadas que representan a la respuesta inmune. El objetivo de este estudio fue evaluar los niveles de expresión de seis genes relacionados con respuesta inmune (KLF, Factor Tipo Kruppel; AbTNF- α , Abulón Factor de Necrosis Tumoral- alfa; MEP, Proteína Expresada por Macrófagos), metabolismo antioxidante (Catalasa; SeGPx, glutatión peroxidasa dependiente de selenio; GSTisof1, glutatión peroxidasa isoforma 1) y proteínas de shock térmico (HSP70 y HSP90) en diferentes tejidos (branquias, postesófago y recto) del abulón rojo cultivado, *Haliotis rufescens* sintomático y asintomático al SD. La expresión de estos genes se compararon con otros relacionados al estrés (Ferritina) y metabolismo (Alginasa), utilizando como gen de mantenimiento la proteína ribosomal L5 (RFLP5). La expresión de genes relacionados con inmunidad y estrés térmico se evaluó mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real. La expresión relativa se estimó a partir del *Ct* promedio del duplicado de cada gen objetivo, normalizando con el valor promedio de *Ct* del gen de referencia (RPL5). Se realizó la comparación de los niveles de expresión de genes entre organismos asintomáticos y sintomáticos a SD. Así como de un grupo control que se trató con oxitetraciclina para garantizar la ausencia de *X. californiensis*. Los resultados indican que los niveles y los perfiles de expresión se alteraron en organismos asintomáticos y sintomáticos en diferentes magnitudes en comparación con el control (LSD). Los tres genes que mostraron los mayores niveles de expresión en organismos asintomáticos fueron; en branquia: GSTisof1 (122.0 veces), Ferritina (11.3 veces) y SeGPx (3.2 veces); en postesófago: GSTisof1 (128.0 veces), Alginasa (36.8 veces) y HSP90 (2.8 veces); en recto: Gstisof1 (84.4 veces), Alginasa (8.6 veces) y SeGPx (2.7 veces). En sintomáticos fueron: branquia GSTisof1 (34.4 veces), Catalasa (14.9 veces) y Ferritina (9.2 veces); postesófago GSTisof1 (55.7 veces), Alginasa (5.6 veces) y HSP90 (3.0 veces); en recto GSTisof1 (19.7 veces), HSP90 (2.2 veces) y Ferritina (2.0 veces). En conclusión, los genes GSTisof1, Alginasa, Ferritina, HSP90, y SeGPx, podrían ser estimulados por la enfermedad (SD), y tener un papel importante en el sistema inmunológico del abulón rojo. Asimismo, la participación de la citoquina AbTNF- α y la

proteína MEP exclusivamente en el grupo ASD podrían eventualmente conducir a la identificación de genes de resistencia a la infección ocasionada por *X. californiensis*.

Palabras clave: ***H. rufescens*, Síndrome de deshidratación, Análisis transcriptómico.**

Abstract of the thesis presented by Luis Miguel Molina Carrillo as a partial requirement to obtain the Master of Science degree with orientation in aquaculture

Expression of immune related genes and heat shock in red abalone *Haliotis rufescens*
asymptomatic to the withering syndrome

Abstract approved by:

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

Dra. Mónica Hernández Rodríguez

Abstract

Withering syndrome (WS) is a chronic disease caused by *Xenohaliotis californiensis*, a Rickettsia-like prokaryote (RLP), which affects several abalone species in wild and culture conditions. However, there is limited information available regarding the effects of this disease on the protective immune response of infected abalone. In this study, we investigated the expression of genes related to: immune (KLF, Kruppel Like Factor; AbTNF- α , Abalone Tumor Necrosis-alfa; MEP, Macrófagos Expressed Protein), antioxidant metabolism (Catalase; SeGPx, Selenium dependent glutathione-S-transferase; GSTisof1, glutathione-S-transferase isoform 1) and heat shock proteins (HSP70 y HSP90) from different tissues (gills, postesophagus and rectum) of cultured red abalone, *Haliostis rufescens*. The expression of these was compared with other genes related with stress (Ferritin) and metabolism (Alginase) using the Ribosomal Protein L5 (RPL5) as a control. Relative expression was estimated from the average *Ct* duplicate of each target gene normalizing the average *Ct* value of the reference gene (RPL5). Additionally, a control group was treated with oxytetracycline to warranty the absence of *X. californiensis*. Our results indicated that expression levels were altered in asymptomatic and symptomatic organisms at different magnitudes compared to the control (LSD). The three genes showed higher expression levels in organisms were asymptomatic; in the gill: GSTisof1 (122.0-fold), Ferritin (11.3-fold) and SeGPx (3.2-fold) in the postesophagus: GSTisof1 (128.0-fold), Alginase (36.8-fold) and HSP90 (2.8-fold), in the rectum: Gstisof1 (84.4-fold), Alginase (8.6-fold) and SeGPx (2.7-fold). The symptomatic organisms showed a increase in the expression of gen GSTisof1 in the gill (34.4-fold), Catalase (14.9-fold) and Ferritin (9.2-fold) ; in the postesophagus GSTisof1 (55.7-fold), Alginase (5.6- fold) and HSP90 (3.0-fold); in the rectum GSTisof1 (19.7-fold), HSP90 (2.2-fold) and Ferritin (2.0-fold). In conclusion, the genes GSTisof1, Alginase, Ferritin, HSP90 and SeGPx could respond to the disease (WS), and may have an important role in the immune system of red abalone. Likewise, the participation of the cytokine AbTNF- α protein and the group exclusively MEP ASD may eventually lead to the identification of resistance genes of *X. californiensis*.

Keywords: *H. rufescens*, *Withering syndrome*, *Transcriptomic analysis*

Dedicatorias

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre Rosalva Carrillo Witron.

Por apoyarme en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi abuelo José Carrillo Castañeda[†].

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizaban y que me inculco siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mi hermano José Hernán Molina Carrillo

Por su apoyo incondicional y del cual aprendí aciertos y de momentos difíciles.

Y a toda mi familia por su apoyo y cariño...

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para mis estudios de Maestría.

Al CICESE por brindarme el apoyo para realizar mis estudios.

Al Instituto de Sanidad Acuícola A. C., por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis.

A mi comité por su asesoría, disposición y aportación a esta tesis.

*Dr. Miguel Ángel del Río Portilla
Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Dr. Jorge Cáceres Martínez
Dra. Rebeca Vásquez Yeomans
Dr. Axayácatl Rocha Olivares*

Al Dr. Miguel Ángel del Río Portilla por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y por toda su valiosa ayuda en estos dos años y de mi vida.

A la Dra. Mónica Hernández Rodríguez y Dr. Jorge Cáceres Martínez por todo su apoyo, asesoría, paciencia y aportación en esta etapa tan importante para mí.

A la Dra. Rebeca Vásquez Yeomans y Dr. Axayácatl Rocha Olivares por su apoyo para el desarrollo del proyecto.

A todo el Departamento de Acuicultura del CICESE, en especial a mis compañeros del Laboratorio de Genética Acuícola Edgar López y Rigoberto Delgado, por sus consejos y aportaciones en esta etapa tan importante para mí.

A mis compañeros de Maestría Jorge Madrid, Pablo Fuentes, Roberto Cruz, David Guzmán, Fabiola Salcedo, Omar Montes, Raquel Escuredo, Araceli Cazares, Paul Vásquez por su valiosa compañía, amistad y apoyo durante este tiempo haciendo más venidero esta etapa de mi vida.

A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel por sus consejos y atenciones durante estos dos años como coordinadora del posgrado y al Dra. Blanca Claudia Farfán por su apoyo como jefe del Departamento de Acuicultura.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, técnico del laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura del CICESE, por su apoyo técnico en el laboratorio y asesoría.

A la M. en C. Carmen Vargas técnico del Laboratorio de Genética Acuícola, por su apoyo técnico en el laboratorio.

Al M. en C. Adrián García y a la Lic. Lil Bidart Escobar Directora de la biblioteca del CICESE por su valioso apoyo en la elaboración de esta tesis

A todos mis maestros por su gran apoyo y motivación para la culminación de mis estudios profesionales y sus consejos.

Al personal secretarial del CICESE, Srita. Bibiana Medina, Sra. Cecilia Loera y Sra. Dalila Mercado.

A todas las personas que me han brindado su compañía y amistad a lo largo de la vida y de este periodo, pues con ustedes, he compartido comentarios, opiniones, desacuerdos, lágrimas, alegrías, fracasos y éxitos, aprendiendo algo en cada día compartido.

Contenido

	Pagina
Resumen	iii
Dedicatorias	vi
Agradecimientos.....	vii
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tablas.....	xii
Capítulo 1	1
Introducción.....	1
1.1 Importancia del abulón en México	1
1.2 Descripción de la especie	1
1.3 Síndrome de Deshidratación o Rickettsiosis del abulón	4
1.3.1 Susceptibilidad.....	5
1.3.2 Distribución de <i>Xenohalotis californiensis</i>	5
1.3.4 Control y prevención	7
1.4 Sistema inmune	7
1.4.1 Inmunidad innata	7
1.5 Genética.....	13
1.5.1 Teorema de la biología molecular (DNA-RNA-Proteína)	13
1.5.2 Características del RNA (transcripción y edición).....	13
Capítulo 2.....	15
Hipótesis y objetivos.....	15
2.1 Hipótesis	15
2.2 Objetivo general.....	15
2.3 Objetivos particulares	15
Capítulo 3.....	16
Materiales y métodos	16
3.1 Diseño experimental	16
3.2 Expresión génica	17
3.3 Extracción de RNA total y Síntesis de cDNA: RT-PCR.....	18
3.4 Optimización de la RT-PCR.....	18
3.4.1 Determinación de T_m óptima.....	18
3.5 Cuantificación mediante RT-PCR	19
3.6 Análisis de la expresión relativa.....	21
3.7 Análisis comparativo del nivel de expresión génica	22
3.8 Diagnóstico por Histología	22
3.9 Extracción de DNA.....	24
3.10 Diagnóstico por PCR	24
3.11 Hibridación <i>in situ</i> (ISH).....	24
3.12 Análisis estadístico	25
Capítulo 4.....	26
Resultados	26
4.1 Niveles de expresión.....	26

4.2.1 Expresión génica en branquia	26
4.2.2 Expresión génica en Postesófago.....	27
4.2.3 Expresión génica en Recto	28
4.2.4 Análisis comparativo del nivel de expresión génica	29
4.3 Prevalencia e Intensidad del síndrome de deshidratación (SD).....	32
4.3.1 Análisis histológico y diagnóstico por PCR tiempo final.....	32
4.3.3 Confirmación de la identidad de <i>X. californiensis</i> por hibridación ISH.	36
Capítulo 5.....	37
Discusión, Conclusiones y Recomendaciones	37
5.1 Discusión	37
5.2 Conclusiones	45
5.3 Recomendaciones	46
Referencias bibliográficas	47
Anexos	63

Lista de Figuras

Figuras		Página
1	Distribución del abulón rojo <i>H. rufescens</i> en México.	2
2	Producción de abulón rojo en Baja California, por acuicultura.	3
3	Imagen que muestra a <i>Haliotis rufescens</i> sin signos (A) y con signos (B) del Síndrome de Deshidratación del abulón (SD).	18
4	Gráfica de amplificación donde puede verse que el gen objetivo (KLF) supera el umbral más rápido que el gen de referencia (RPL5).	22
5	Diagrama de Venn mostrando la intersección de dos conjuntos	23
6	Análisis transcripcional del abulón rojo <i>H. rufescens</i> sintomático (SSD) y Asintomático (ASD) al Síndrome de Deshidratación en branquias.	27
7	Análisis transcripcional del abulón rojo <i>H. rufescens</i> sintomático (SSD) y Asintomático (ASD) al Síndrome de Deshidratación en postesófago.	29
8	Análisis transcripcional del abulón rojo <i>H. rufescens</i> sintomático (SSD) y Asintomático (ASD) al Síndrome de Deshidratación en recto.	30
9	Se muestran los diagramas de Venn mostrando el número de transcripciones por tejido (branquia, postesófago y recto) en abulón rojo.	33
10	Imágenes que muestran a <i>Haliotis rufescens</i> infectado con <i>Xenohaliotis californiensis</i> .	36
11	Detección de <i>Xenohaliotis californiensis</i> en <i>Haliotis rufescens</i> por PCR con el uso de oligonucleótidos de la región hipervariable V1 16S ribosomal.	37
12	Detección de PTRs en <i>H. rufescens</i> por Hibridación <i>in situ</i> .	37

Lista de Tablas

Tablas		Página
1	Empresa de cultivo de abulón en México en el 2008 incluyendo el año de inicio de operaciones.	3
2	Variación en I a prevalencia de <i>X. californiensis</i> entre las especies y diagnóstico.	7
3	Secuencias de iniciadores usados para RT-PCR en tiempo real. Escala de intensidad de PTR	19
4	Escala de la intensidad por PTRs	25
5	Resumen de las respuestas transcripcionales de genes contra <i>X. californienis</i> en las branquias, postesófago y recto del abulón	28
6	Prevalencia e intensidad de la infección por el síndrome de deshidratación, índice de condición y signos a SD.	37

Capítulo 1

Introducción

1.1 Importancia del abulón en México

De acuerdo con Guzmán del Prío (1992), uno de los principales productores de mariscos en México, es el estado de Baja California en donde se explota una gran diversidad de organismos tales como: abulón, langosta, ostión, erizo, mejillón, pulpo, camarón, calamar y almeja, entre otros. Hasta el momento uno de los moluscos de mayor importancia comercial en el estado es el abulón (Searcy-Bernal *et al.*, 2010). Debido a su importante valor comercial, elevada demanda en el mercado internacional y relativa facilidad de captura, este recurso fue y sigue siendo sobreexplotado, causa por la cual, la producción ha ido disminuyendo de 3,500 toneladas en 1960 a sólo 400 toneladas anuales durante la década de los 80s provocando un importante declive de la pesquería nacional (Searcy-Bernal *et al.*, 2010). La caída que ha tenido la pesquería de abulón se hace evidente al observar que en el año 2008 se produjeron apenas 318 toneladas (D.O.F., 2012¹). La implementación de la acuicultura tiende hacer una de las actividades más prometedoras para cubrir la gran demanda del recurso. El interés por el cultivo de abulón a nivel mundial se ha desarrollado rápidamente, no solo por el declive de las pesquerías, si no, por el aumento en el precio comercial, lo cual ha generado que este tipo de cultivos se implementen y se desarrollen en muchos países (Troell *et al.*, 2006).

1.2 Descripción de la especie

Los abulones son moluscos gasterópodos marinos del género *Haliotis*. De las diferentes especies que se encuentran alrededor del mundo solo 17 son consideradas con interés comercial (Hahn, 1989). Una de ellas es el abulón rojo, *Haliotis rufescens*, descrita como la especie más grande con una talla máxima reportada hasta el momento de 31.3 cm correspondiente a un organismo de aproximadamente 5 kg de peso vivo (Leighton, 2000). Las características particulares de esta especie relacionadas con su

¹ Diario Oficial de la Federación (D.O.F.)

adaptabilidad han impulsado el cultivo y su desarrollo en varios países alrededor del mundo como EU, Chile y México (Flores-Aguilar *et al.*, 2007). El abulón rojo es una especie originaria de las costas del Pacífico de Norteamérica, distribuyéndose desde Bahía Sunset, Oregón, EUA hasta Bahía Tortugas, Baja California Sur, México (Fig. 1). Generalmente es encontrada en zonas rocosas, desde la zona supramareal hasta 165 m de profundidad, con una mayor abundancia entre 6-15 m, en donde predominan distintas macroalgas y microalgas bentónicas de las que se alimenta tanto en su etapa adulta como en las primeras etapas de su desarrollo (Leighton, 2000).

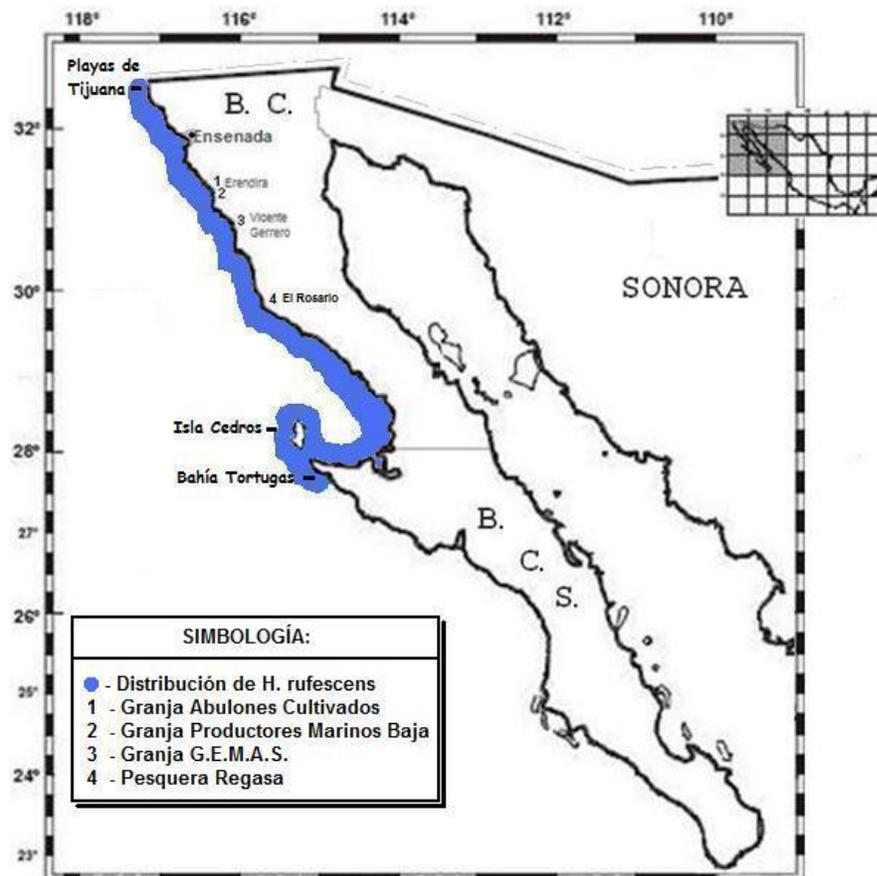


Figura 1. Distribución del abulón rojo, *H. rufescens*, en México (Leighton 2000, p. 216) y las granjas comerciales de Baja California (Searcy-Bernal *et al.* 2010).

En el trabajo realizado por Searcy-Bernal *et al.* (2010), destaca que la producción acuícola en la costa occidental de la península de Baja California depende principalmente del abulón rojo, *H. rufescens*, tal actividad inició con el establecimiento de la primera granja comercial en 1989, con una cooperativa que llegaría a ser una

empresa privada denominada Abulones Cultivados en 1992. Para 2008, ya existían cuatro empresas dedicadas al cultivo de abulón (Tabla 1) (Searcy-Bernal *et al.*, 2010).

Tabla 1. Empresas de cultivo de abulón en México para el 2013, incluyendo el año de inicio de operaciones.

Empresa	Ubicación	Año
Abulones Cultivados	Eréndira	1992
Productores Marinos Baja	Eréndira	2003
GEMAS	Colonia Vicente Guerrero	1999
Asociación Pesquera REGASA	El Rosario	2007

CESAIBC, (2013). Recuperado de <http://www.cesaibc.org/sitio/fichas-moluscos.php>.

La producción de abulón cultivado para 2010 alcanzó las 22.8 t en peso total, y de acuerdo con los datos presentados en la Figura 2 (D.O.F., 2012) es evidente que el desarrollo de esta actividad comercial se ha mantenido en un ritmo muy lento, a pesar de contar con condiciones naturales relativamente adecuadas para el cultivo y bajo costo de la mano de obra en la región. De acuerdo con Searcy-Bernal *et al.* (2010) el lento desarrollo de esta actividad es el resultado de varios factores, entre ellos: el riesgo involucrado en este tipo de industria la cual requiere tiempos de cultivo de entre 4 y 5 años, inversiones iniciales altas, la falta de infraestructura adecuada para algunas áreas costeras y los altos costos de operación (energía, importación de equipos e insumos, etc.).

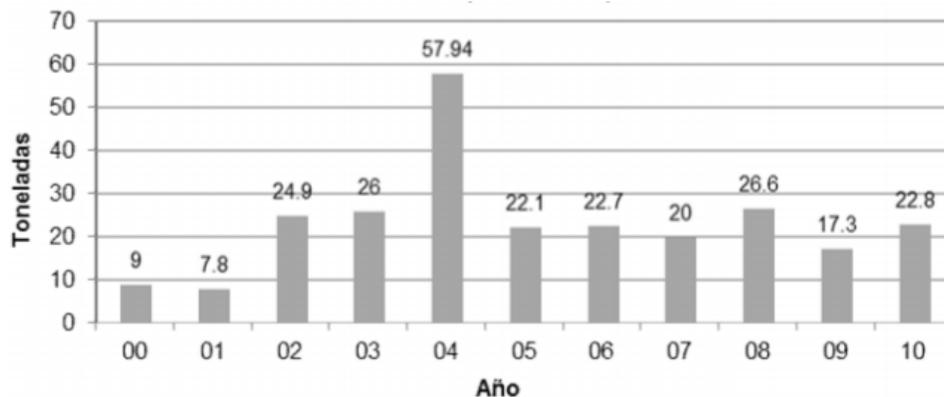


Figura 2. Producción de abulón rojo en Baja California por acuicultura (D.O.F. 2012, p.39).

Aunado a lo anterior, Cook y Gordon (2010) puntualizan que la aparición de enfermedades infecciosas y la elevada repercusión económica que supondría la

manifestación de las mismas, hacen menos probable que se establezcan nuevas granjas, generando más retos para la actual industria a nivel regional y mundial.

1.3 Síndrome de Deshidratación o Rickettsiosis del abulón

A pesar de que se han detectado diversos parásitos en abulones, uno que ha tomado mucho interés por sus antecedentes y la identificación en nuestro país es la infección causada por *Xenohalotis californiensis* (Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rickettsiales; Anaplasmataceae). La enfermedad causada por esta bacteria se conoce como síndrome de deshidratación (SD) también conocida como rickettsiosis del abulón (Haaker *et al.*, 1992; Friedman *et al.*, 2000).

El SD es una enfermedad letal para algunas especies de abulón del género *Haliotis* y, aunque se ha demostrado que todas las fases postlarvarias son susceptibles a la infección por *X. californiensis*, en abulones de cultivo la enfermedad se ha observado generalmente en animales menores a un año de edad y en organismos silvestres se ha encontrado para todas las clases de tamaño (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 1997; Haaker *et al.*, 1992; Steinbeck *et al.*, 1992; Van Blaricom *et al.*, 1993). Los signos externos de la enfermedad incluyen: reducción del manto y del músculo del pie, glándula digestiva decolorada, flacidez del músculo, debilidad y letargo (Balseiro *et al.*, 2006; Friedman *et al.*, 2000; Gardner *et al.*, 1995). Además, la enfermedad a nivel histológico se caracteriza por inclusiones bacterianas intracelulares en el esófago posterior, glándula digestiva y en el intestino; mostrando que las infecciones moderadas y graves se asocian con cambios degenerativos o metaplásicos de la glándula digestiva seguidos por atrofia del músculo del pie (Friedman *et al.*, 2000). Estos cambios generalmente están relacionados con el consumo de reservas de glucógeno seguido del uso del músculo del pie como fuente de energía, deteriorando la condición fisiológica del organismo (Friedman *et al.*, 2002; Gardner *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 2001). De acuerdo con datos obtenidos por González *et al.* (2012), en el abulón rojo *H. rufescens* de cultivo, las infecciones por *X. californiensis* pueden ejercer un efecto negativo sobre el rendimiento fisiológico (tasa de ingestión, metabolismo basal, relación oxígeno/nitrógeno y producción de heces) de la especie, aun cuando la enfermedad no es evidente.

1.3.1 Susceptibilidad

La susceptibilidad de los abulones a la bacteria que causa el SD varía según la especie; en el abulón negro (*H. cracherodii*) se ha reportado hasta un 99% de mortalidad (Friedman *et al.*, 2002), en blanco (*H. sorenseni*) hasta 100% de mortalidad (Friedman, 2012), en abulón rojo (*H. rufescens*) hasta el 35% de mortalidad (Moore *et al.*, 2001). A diferencia de las especies de abulón antes mencionadas y de acuerdo con datos de Friedman (2012), la mortalidades relacionados con el abulón azul (*H. fulgens*) y amarillo (*H. corrugata*), no están bien estudiadas. Sin embargo, la información presentada por Álvarez-Tinajero *et al.* (2002) muestran que posiblemente el 100% de los abulones azules y el 63% de abulones amarillos en las Islas de Cedros y San Benito en Baja California, México pueden estar infectados por procariontas tipo rikettsia (PTR). En el caso del abulón rojo de acuerdo con Friedman *et al.* (2003) estas infecciones pueden persistir por mucho tiempo sin que se desarrolle la enfermedad cuando el hospedero se mantiene a temperaturas $\leq 15^{\circ}\text{C}$; la exposición en agua de mar a temperaturas $>17^{\circ}\text{C}$ para el abulón rojo, negro y blanco, normalmente está relacionada con un aumento en la expresión de la enfermedad. El período de incubación (periodo entre la infección y el inicio clínico de la enfermedad) del síndrome de deshidratación en el abulón rojo *H. rufescens* es prolongado y varía entre tres y siete meses (Moore *et al.*, 2001; Braid *et al.*, 2005).

1.3.2 Distribución de *Xenohaliotis californiensis*

De acuerdo con datos hasta 2012, *X. californiensis* está presente a lo largo de la costa del suroeste de Norteamérica en California, EE.UU. y en Baja California, México (Friedman, 2012). Sin embargo, como posiblemente se han transportado abulones infectados a Chile, Japón y a otros países, es de esperarse que el área geográfica del agente etiológico del SD se haya extendido a otras zonas de cultivo del abulón rojo de California, *Haliotis rufescens*. En México, los primeros registros de mortalidades inusuales ocurrieron hasta 1997 después de que el fenómeno de El Niño afectara a las granjas de cultivo y a las pesquerías de abulón, pero los primeros estudios que detectaron por primera vez la presencia de PTR fueron: en el abulón negro por Valles (1998); en el abulón rojo de cultivo por Cáceres-Martínez y Tinoco-Orta (2001); en el abulón azul y amarillo por Álvarez-Tinajero *et al.* (2002). En 2011, se demostró que la

PTR encontrada en los estudios antes mencionados corresponden a *X. californiensis*, lo cual confirma su distribución en la costa oeste de América del Norte, abarcando por lo menos, desde Punta San Pedro (Condado de San Francisco, California) hasta Isla de Cedros en Baja California, México (Cáceres-Martínez *et al.*, 2011); mientras que la prevalencia varía de acuerdo a la especie y al tipo de diagnóstico (Tabla 2).

Tabla 2. Variación en la prevalencia de *X. californiensis* entre las especies y diagnóstico.

<i>Especie</i>	<i>Prevalencia por PCR</i>		<i>Prevalencia por histología</i>		<i>Referencias</i>
	<i>Silvestre</i>	<i>Cultivado</i>	<i>Silvestre</i>	<i>Cultivado</i>	
<i>Haliotis rufescens</i>	ND	0-100%	1-75% ¹	84-100%	Friedman y Finley, 2003; Moore <i>et al.</i> , 2000; Cáceres-Martínez y Tinoco-Orta, 2001; Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2009;
				85-100% ²	Vásquez-Yeomans, 2009;
<i>Haliotis crachelodii</i>	ND	NA	74-98%	NA	Friedman y Finley, 2003.
<i>Haliotis sorenseni</i>	0	0-100%	0	0-100%	Friedman <i>et al.</i> , 2007 Moore <i>et al.</i> , 2001.
<i>Haliotis fulgens</i>		ND	44-100%	80-100%	Álvarez-Tinajero <i>et al.</i> , 2002; Moore <i>et al.</i> , 2009; Cáceres-Martínez, J., y Vásquez-Yeomans, R., 2010.
			95.4%		Cruz-Flores <i>et al.</i> , 2013. ³
<i>Haliotis corrugata</i>		ND	62-63%	ND	Álvarez-Tinajero <i>et al.</i> , 2002; Cruz-Flores <i>et al.</i> , 2013. ³
			65.5%		
<i>Haliotis diversicolor Supertexta</i>	ND	61%	ND	53%	Wetchateng, 2008; Wetchateng <i>et al.</i> , 2010. ⁴
<i>Haliotis tuberculata</i>	ND	ND	0%	14.5-52%	Balseiro <i>et al.</i> , 2006

(1) Se han observado prevalencias del 1–17% en el norte de California y hasta del 75% en el sur y centro de California.

(2) 45 abulones con una talla promedio de 6.67 cm fueron muestreados en una granja en Baja California, México.

(3) Los muestreos se realizaron en la principal zona de captura de la península de Baja California Sur, México.

(4) Sólo 36 animales fueron muestreados de una granja en Tailandia.

ND = no hay datos; NA = no aplicable

1.3.4 Control y prevención

Un tratamiento probado contra la rickettsiosis del abulón ha sido el uso de oxitetraciclina (OTM) ya sea por inyección en el músculo del pie, incorporación en la dieta o baños (Moore *et al.*, 2001; Friedman *et al.*, 2003; García-Esquivel *et al.*, 2011).

Otro de los métodos con gran potencial para reducir el impacto de las enfermedades infecciosas es aumentar la resistencia del hospedero. Por lo que es importante generar información que permita tener una mayor comprensión de las bases funcionales de los componentes genéticos involucrados en la respuesta inmune a *X. californiensis*. Esta información podría contribuir al desarrollo de herramientas y estrategias que permitan atenuar los efectos de la infección por *X. californiensis* en poblaciones de cultivo y silvestres.

Actualmente en México se desarrolla el proyecto denominado: “*Diagnóstico sobre la disminución de la poblaciones de abulón en la costa occidental de la península de Baja California y estrategias para atenuar los impactos negativos*” en este proyecto interinstitucional participa el Centro de Investigación y Educación Superior de Ensenada (CICESE), y tiene como objetivo estudiar las posibles causas que ocasionan la mortalidad del abulón en la península de Baja California.

1.4 Sistema inmune

1.4.1 Inmunidad innata

Si bien en invertebrados no se ha demostrado la existencia de un sistema inmune como se conoce en vertebrados, se considera que los mecanismos de defensa básicos como la fagocitosis y encapsulación, así como los factores que los regulan, constituyen dicho sistema inmune. El correcto funcionamiento de dicho sistema es vital para una eficiente respuesta ante organismos patógenos y a diferentes estresores (Villena, 2003). Los mecanismos que subyacen a estos componentes de defensa están relacionados con la presencia de proteínas especializadas que participan en cantidades adecuadas, dentro de un determinado marco de tiempo (De Zoysa *et al.*, 2011). De acuerdo con Loker *et al.* (2004) estas proteínas están codificadas por genes cuya expresión es fuertemente regulada por las células, y solamente se estimulara la síntesis de aquellas proteínas que se necesiten en determinado momento.

En el sistema inmune de los moluscos, los hemocitos tienen un papel muy importante y están involucrados en las actividades relacionadas con la fagocitosis (Hooper *et al.*, 2007; Canesi *et al.*, 2002), secreción de péptidos antimicrobianos (Mitta *et al.*, 2000), y producción de especies oxígeno reactivas (ROS, por sus siglas en inglés²). La actividad oxidativa a través de la producción de ROS es considerada como una de los principales mecanismos implicados en la respuesta inmune contra agentes patógenos (Babior *et al.*, 1973), ya que funcionan como medios de comunicación intracelular relacionados con la inmunidad, la supervivencia celular, apoptosis y respuesta inflamatoria (Limón-Pacheco *et al.*, 2009). La producción en exceso de ROS puede dar lugar a varios efectos negativos tales como la peroxidación lipídica, daño en el DNA y pérdida de la función celular (Di-Giulio *et al.*, 1989; Van der Oost *et al.*, 2003), debido a este proceso las células poseen sistemas de defensa para protegerse así mismas del daño oxidativo donde se ven involucradas una serie de enzimas antioxidantes, entre las cuales se destacan: catalasa, glutatión peroxidasa dependiente de selenio (SeGPx), glutatión peroxidasa (GPx), tiorredoxín peroxidasa (TPx) y tiorredoxina (TRx) (Roch *et al.*, 1999), cuya función principal no solo es reducir el estrés oxidativo, si no mantener los niveles adecuados de ROS para un control eficiente de las infecciones causadas por organismos patógenos. Así lo reportan varios estudios en especies de moluscos como las ostras, vieiras, mejillones, almejas (Hooper *et al.*, 2007; Donaghy *et al.*, 2009) y recientemente documentadas en el abulón del Pacífico *Haliotis discus discus* por De Zoysa *et al.* (2011). Dentro de este mismo esquema, otro grupo de enzimas que participan como agentes antioxidantes son las Glutatión S-transferasa (GSTs) cuya función principal asignada es de defensa celular contra la toxicidad inducida generalmente por compuestos xenobióticos generalmente de tipo lipofílico (Blanchette *et al.*, 2007). Estudios previos encontraron que los niveles de expresión de GSTs se incrementan tras la exposición al peróxido de hidrógeno, metales pesados (Lee *et al.*, 2007) y productos químicos que dañan el sistema endocrino como hidrocarburos aromáticos policíclicos, policlorados bifenilos y tributilestaño (Wan *et al.*, 2008). Aunque aún no se establecen criterios formales para clasificar a las GSTs en organismos marinos, las actividades y los niveles de transcripción de las GSTs han sido

² De aquí en adelante las siglas de los genes se presentarán en inglés.

ampliamente investigadas en algunas especies acuáticas, principalmente en la utilización como biomarcadores durante la exposición a contaminantes orgánicos e inorgánicos. Las GSTs se han identificado en algunos moluscos marinos, como en el calamar (*Ommastrephes sloani pacificus*) (Tomarev *et al.*, 1993), el mejillón (*Mytilus edulis*) (Yang *et al.*, 2004), en la almeja (*Mercenaria mercenaria*) (Blanchette *et al.*, 1999), el mejillón del Mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) (Hoarau *et al.*, 2006) y en el abulón disco (*H. discus discus*) se ha detectado una isoforma (GSTisof1, Wan *et al.*, 2008).

Las investigaciones recientes sobre la defensa inmune en moluscos están recibiendo mucha atención, no solo en la identificación y caracterización de enzimas antioxidantes, sino también de moduladores inmunológicos. Se han estudiado los niveles de expresión de genes asociados con la respuesta inmune en diferentes tejidos del abulón del Pacífico, *Haliotis discus discus* después de un desafío bacteriano; se encontraron algunos reguladores como el Factor de Necrosis Tumoral- alfa (TFN- α), Factor tipo Kruppel (KLF), Lachesin (Lac) y Activador transcripcional de Interleucina-3 (NFLI-3) (De Zoysa *et al.*, 2011). Otra de las proteínas con las cuales se han realizado trabajos de respuesta inmune en abulón amarillo, *H. corrugata*, y en el abulón rojo, *H. rufescens*, son las tipo perforina conocidas también como *Proteína expresada por macrófagos* (MEP) (Mah *et al.*, 2004).

Factor de Necrosis Tumoral- alfa (TNF- α). Es una citoquina involucrada en el proceso inflamatorio producido principalmente por macrófagos activos en vertebrados e induce a la muerte celular programada (apoptosis), activando la expresión de las moléculas de adhesión endotelial. Esto resulta en una migración rápida de leucocitos al espacio extravascular, con lo que participa en la activación, proliferación, diferenciación y migración de células inmunocompetentes (Casadevall *et al.*, 2009). De Zoysa *et al.* (2009) encontraron un homólogo de la familia TNF (AbTNF- α) en el abulón disco *H. discus discus* durante la exposición a salinidades bajas y a estrés por hipoxia.

Factor Tipo Kruppel (KLF). Pertenece a una importante familia de proteínas que han sido ampliamente estudiadas por su papel en la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia, especialmente en el contexto de la remodelación de la cromatina y la

activación transcripcional del promotor β -globina (La globina es la parte proteica de la hemoglobina [apoproteína] en vertebrados). Sin embargo, datos recientes indican que también puede jugar un papel en la proliferación de células eritroides (Coghill *et al.*, 2001). En invertebrados funciona como un represor/activador de la transcripción de genes en contextos específicos de estrés celular ocasionado por diferentes factores (Chen *et al.*, 2001).

Proteína Expresada por Macrófagos (MEP). Es una proteína citolítica que desempeñan un papel esencial en la inmunidad innata en abulones (Mah *et al.*, 2004). Está implicada en la diferenciación y maduración de macrófagos, y tiene un papel importante en la eliminación y muerte bacteriana tanto para bacterias Gram-negativas como Gram-positivas (Xiaocui *et al.*, 2011).

Proteínas de Shock Térmico (HSP). En los procesos de desarrollo y diferenciación celular se encuentra este tipo de proteínas denominadas de “*choque o shock térmico*” debido a que su síntesis es inducida principalmente por un incremento de la temperatura. Sin embargo, la expresión de las mismas puede verse también estimulada por la carencia de oxígeno, la presencia de metales pesados, agentes físicos y químicos o cualquier factor que produzca algún tipo de estrés celular (Craig, 1985; Lindquist y Craig, 1988; Veldhuizen-Tsoerkan *et al.*, 1991). La expresión de estas proteínas puede estar modulada por el estrés, pero se ha demostrado que en condiciones normales se encuentran asociadas a procesos de plegamiento proteico, actuando como chaperonas, participando en procesos de desarrollo y de diferenciación celular (Schlesinger, 1990; Hartl, 1996). La clasificación de la familia de HSPs se realiza de acuerdo a su peso molecular, el cual puede variar de entre 15 y 110 kDa (Welch, 1992; Hightower y Hendershot, 1997). Las más estudiadas en moluscos bivalvos son la HSP70 y la HSP90. En varias especies de moluscos bivalvos se han caracterizado parcial o totalmente alguna de estas proteínas. En el ostión japonés (*Crassostrea gigas*) (Gordon *et al.*, 2000; Boutet *et al.*, 2003) y en el ostión americano (*Crassostrea virginica*) (Rathinam *et al.*, 2000) se ha determinado la secuencia de la HSP70 al igual que en la ostra plana (*Ostrea edulis*) (Piano *et al.*, 2005). En las vieiras *Argopecten irradians* y *Chlamys farreri* se caracterizaron la HSP70 y 90 respectivamente (Song *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2007), ambas proteínas se han detectado en varias especies de

abulón, *H. tuberculata*, *H. discus hannai* y *H. rufescens* (Farcy *et al.*, 2007; Peizhou *et al.*, 2007; Núñez-Acuña *et al.*, 2009). La modulación de éstas también se ha relacionado con procesos inmunes, ya que su expresión se ha visto incrementada tras la estimulación de los hemocitos con *Vibrio anguillarum* (Cellura *et al.*, 2006 y 2007; Song *et al.*, 2006). Además se han encontrado varios marcadores de secuencias expresadas (ESTs, por sus siglas en inglés, *Expressed Sequence Tag*) con homología a HSP en varias bibliotecas construidas tras una estimulación bacteriana o parasitaria (Tanguy *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2006; Gestal *et al.*, 2007) refrendando la posible participación de estas proteínas en los mecanismos de defensa inmune.

Ferritina es otra proteína de estrés que participan activamente en los procesos de homeostasis celular y en la defensa celular contra el estrés oxidativo producido por las ROS. La función principal de la ferritina en la mayoría de los organismos en los cuales se ha encontrado es la de almacenamiento de hierro. La capacidad para captar el hierro tóxico celular en exceso de una manera compacta y segura, da a esta proteína un papel clave en el almacenamiento de hierro y desintoxicación. En respuesta al estrés oxidativo, las células activan una estrategia de defensa utilizando ferritina para restringir la disponibilidad del metal, el exceso de hierro específicamente libre para suprimir la reacción de Fenton's (procesos de oxidación) (Anexo 1) y de ese modo evitar la formación de OH^- que produce daño a biomoléculas como proteínas, lípidos y DNA (De Zoysa *et al.*, 2009; Kleinveld *et al.*, 1989; Storey *et al.*, 1996).

Como se describió al inicio de este tema, el sistema inmune es una red compleja de células, tejidos y órganos que funcionan en conjunto con el objetivo de proteger contra organismos patógenos y que en el desarrollo y su funcionamiento óptimo influyen factores esenciales como el adecuado balance nutricional de los organismos. Silva-Aciaras *et al.* (2013) muestran que las regulaciones transcripcionales requieren de un elevado coste energético. Además los resultados en diversos trabajos (Wang *et al.*; 2008a; Travers *et al.*, 2010) muestran una estrecha interrelación entre el sistema inmune y el metabolismo digestivo, encontrando amplios vínculos tanto morfológicos como funcionales, lo que sugiere una fuerte relación entre balance energético y la resistencia a organismos patógenos y otros estresores. Como parte complementaria al presente trabajo se evaluó la expresión del gen de la enzima Alginasa, la cual pertenece a la

familia de enzimas conocidas como liasas carbono-oxígeno que actúan sobre polisacáridos (distribuidos ampliamente en las paredes celulares de las algas marinas pardas) (Nakada y Sweeny, 1967), con el fin de conocer aspectos relacionados con el metabolismo digestivo en organismos afectados por el SD.

Por otro lado, para evaluar la respuesta inmune y el estrés en abulón se utilizan en su mayoría ensayos de fagocitosis (Sahaphong *et al.*, 2001), producción de ROS (Martello *et al.*, 2001), conteo de hemocitos y su morfología (Cheng *et al.*, 2004). Sin embargo, es importante conocer los cambios transcripcionales a nivel molecular, ya que todas estas reacciones de respuesta inmune y de estrés están relacionadas con la expresión génica (De Zoysa *et al.*, 2011). De acuerdo con De Zoysa *et al.* (2011) en el abulón las células inmunes (hemocitos) presentan un menor potencial de inducción transcripcional en comparación con las branquias. Lo cual indica que, para evaluaciones de expresión génica relacionadas con los mecanismos de defensa en abulones, es recomendable utilizar a las branquias como un tejido confiable para evaluar el nivel de actividad de los genes relacionados con la respuesta inmune en condiciones de estrés ocasionado por agentes patógenos. Asimismo, las branquias presentan un epitelio especializado que les permite el intercambio de iones y gases. Por lo tanto, los patógenos podrían fácilmente entrar en contacto con las branquias, siendo así, que se ha catalogado como un tejido muy eficiente en generar una respuesta inmune tanto en abulón como en otros moluscos (De Zoysa *et al.*, 2011). Otro de los tejidos importantes para la evaluación transcripcional es el tracto digestivo, este tejido se encuentra constantemente expuesto a una amplia variedad de patógenos microbianos y es considerado como una ubicación privilegiada para albergar una gran variedad de bacterias (Paillard *et al.*, 2004). En el presente estudio la enfermedad por PTR se caracteriza por inclusiones bacterianas intracelulares en el esófago posterior, en intestino y en el estómago. De tal modo, aún que las branquias no son el tejido blanco, pueden proporcionar un mejor conocimiento sobre la actividad transcripcional en el abulón rojo cuando es afectado por el SD. Diversos estudios sobre expresión génica en abulón han utilizado a las branquias y la glándula digestiva como tejidos que generan información confiable en evaluaciones transcripcionales relacionadas con la respuesta inmune: *H. diversicolor*, *H. tuberculata*, *H. rufescens*, *H. discus discus* (Hong-Lin *et al.*, 2009; Travers *et al.*, 2010; Salinas-

Clarot *et al.*, 2010; De Zoysa *et al.*, 2011) y en el ostión japonés (*C. gigas*) y el ostión americano (*C. virginica*) (Jenny *et al.*, 2007). Estos estudios de expresión génica son de gran importancia debido a la identificación de genes regulados positivamente, tanto en branquias como en los tejidos del tracto digestivo. Refrendando la importante capacidad de transcripción de estos tejidos ante organismos patógenos.

1.5 Genética

1.5.1 Teorema de la biología molecular (DNA-RNA-Proteína)

De acuerdo al teorema central de la biología molecular, la expresión de la información hereditaria fluye desde las secuencias genómicas del ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés, DNA), a través de un intermediario, el ácido ribonucleico mensajero (mRNA, por sus siglas en inglés), hacia una última manifestación del genotipo en relación al tipo de ambiente (fenotipo) en forma de polipéptidos funcionales (Farrell, 2010). Este diseño refleja lo que ocurre en células procariontas y eucariotas, sólo algunas excepciones han sido observadas en la naturaleza: el descubrimiento de la enzima retroviral transcriptasa inversa, por la cual el mRNA puede servir como un molde para la síntesis de DNA (denominado también como DNA complementario o cDNA, por sus siglas en inglés) (Farrell, 2010).

1.5.2 Características del RNA (transcripción y edición)

La transcripción del mRNA se describe como el proceso por el cual una molécula de mRNA de cadena simple es sintetizada desde un locus cromosomal específico, y es uno de los primeros pasos que se conoce como la biogénesis del mRNA (Farrell, 2010). La unidad transcripcional o propiamente expresada se conoce como una secuencia de DNA que manifiesta señales para el inicio y termino de la transcripción. Este mecanismo es regulado por enzimas conocidas como RNA polimerasas. Las enzimas conocidas como factores de transcripción, reconocen secuencias altamente conservadas denominadas promotores. De acuerdo con Farrell (2010), en eucariotas, el promotor es conocido como la caja TATA, formalmente la caja Hogness; aunque la caja CAAT y la caja GC también han sido encontradas en muchos promotores. Éstos parecen estar controlando la unión inicial de la RNA polimerasa mediada por el factor

de transcripción y determinada por la eficiencia del promotor (Farrell, 2010). En eucariotas se ha revelado que en la mayoría de sus genes hay muchos nucleótidos dentro de un locus particular respecto a los que son necesarios para dirigir la síntesis de un polipéptido determinado, en otras palabras, la secuencia de DNA y la de un aminoácido no son colineales. Este patrón diferencial también es observado a nivel del mRNA en el citoplasma, el cual tiende a ser más corto respecto a la secuencia de DNA origen. Esto se explica por la presencia de intrones, (regiones de DNA que se transcriben) pero éstos no están representados en el mRNA maduro, ya que son cortados del mRNA primario o inicial (Farrell, 2010). Por lo anterior, y de acuerdo con McPerson *et al.* (2008), la expresión de un determinado gen tiende hacer proporcional con el número de copias de mRNA, por lo que se puede obtener información respecto a la expresión, nivel de respuesta y finalmente determinar si la expresión de los genes de una célula está relacionada con una función conocida (McPherson *et al.*, 2008). Para cuantificar la expresión relativa de los genes objetivo se empleó la técnica de síntesis de cDNA mediante retrotranscripción, seguida de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés). Esta herramienta molecular apoyará en la amplificación y cuantificación de las moléculas de cDNA (Heid *et al.*, 1996) y con estos datos obtener información respecto al nivel de respuesta de los organismos en estudio. Por lo cual en el presente trabajo se evaluaron los niveles de expresión de genes inmunorrelacionados y de estrés térmico, en el abulón rojo de cultivo, *Haliotis rufescens*, sintomático al síndrome de deshidratación.

Capítulo 2

Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

Los abulones rojos asintomáticos al SD presentarán una mayor expresión de genes inmunorrelacionados y de estrés térmico, que los abulones sintomáticos.

2.2 Objetivo general

Evaluar los niveles de expresión de genes inmunorrelacionados y de estrés térmico en el abulón rojo, *Haliotis rufescens*, sintomático al síndrome de deshidratación.

2.3 Objetivos particulares

1. Analizar los niveles de expresión de genes inmunorrelacionados y de estrés térmico, en diferentes tejidos de abulones sintomáticos y asintomáticos al SD.
2. Determinar la prevalencia e intensidad del síndrome de deshidratación por análisis histopatológico, diagnóstico en PCR tiempo final e hibridación *in situ*.
3. Realizar un análisis comparativo del nivel de expresión génica en respuesta a *Xenohaliotis californiensis*.

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1 Diseño experimental

Se seleccionaron un total de 150 ejemplares de abulón rojo *H. rufescens* (longitud de la concha 5.9 ± 0.6 cm y peso vivo de 29 ± 4 g) de la granja “Abulones Cultivados S. A. de C. V.” en agosto de 2012. Los organismos fueron separados de acuerdo con la presencia o ausencia de signos externos del SD. Estos signos son: incapacidad para adherirse firmemente al sustrato, retracción del manto y reducción del músculo. Aquellos con signos fueron etiquetados como Sintomáticos al Síndrome de Deshidratación SSD y aquellos sin signos como Asintomáticos al Síndrome de Deshidratación ASD (Fig. 3). Adicionalmente, se estableció una escala asociada a los signos mencionados, definiéndose de la siguiente manera: 1, leve; 2, moderada y 3, severa de acuerdo con Moore *et al.* (2001). Los animales fueron aclimatados durante tres semanas antes de iniciar los experimentos. Durante este período, los organismos fueron mantenidos en sistemas de recirculación independiente (Bioclarificador remoción de sólidos a $20 \mu\text{m}$ y filtración biológica) con un flujo de $33\text{-}38 \text{ l min}^{-1}$, en un volumen total de 200 l a una temperatura de $19 \pm 0.8^\circ\text{C}$. Se alimentaron *ad libitum* con la macroalga marina *Macrocystis pyrifera*. Se realizó la biometría (longitud de la concha y peso total) de 30 abulones muestreados para cada grupo (SSD y ASD). Con la información obtenida se estimó el índice de condición (IC):

(1)

$$IC_j = \frac{P_j}{aL_j^b}$$

donde IC_j , P_j y L_j son el índice de condición, el peso(g) y el largo de la concha (cm) del abulón j , respectivamente, mientras que a y b son constantes obtenidas mediante la relación alométrica ($a=0.1555$ y $b=2.9127$; Del Río-Portilla y Velasco-Miranda, 2007).

Por otro lado, 30 abulones de cada condición (SSD y ASD) fueron sacrificados para determinar la infección por *X. californiensis* y el desarrollo del SD a nivel tisular (ver en sección 4.3.1 Análisis histopatológico). Dado que todos los abulones estuvieron infectados por la rickettsia, se realizó un tratamiento con baños de oxitetraciclina a 30

de estos organismos de acuerdo con el protocolo indicado en el Anexo 2. Este grupo fue utilizado como control para el análisis de expresión génica. Es decir, libre de infección por *X. californiensis* (LSD) y así obtener el valor del umbral de expresión necesario para la curva de normalización. Estableciéndose al final 3 grupos: SSD, ASD y LSD.

Para confirmar la presencia de *X. californiensis* se utilizó un análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo final e hibridación *in situ*.

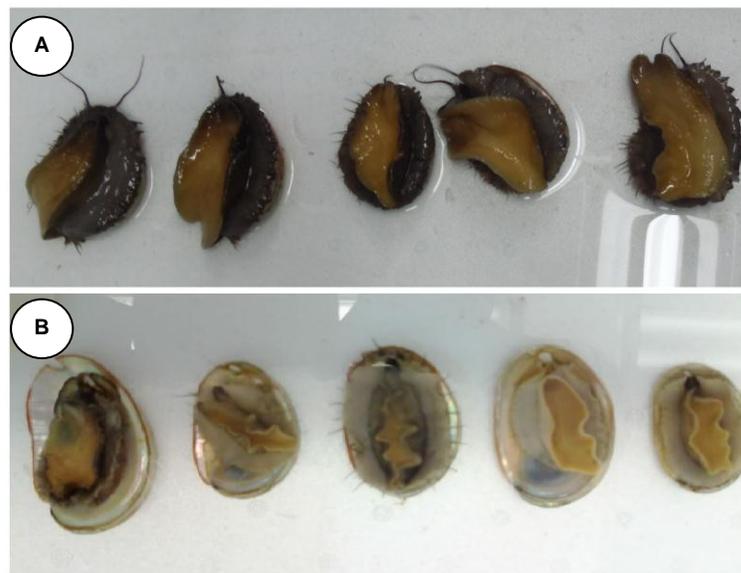


Figura 3. Imagen que muestra a *Haliotis rufescens* sin signos (A) y con signos (B) del Síndrome de Deshidratación del abulón (SD). A) se observan cinco ejemplares con el músculo del pie extendido, coloración normal y activos. B) se observan ejemplares afectados por el SD con el manto completamente retraído, el músculo del pie flácido y descolorido.

3.2 Expresión génica

Para determinar los niveles de expresión génica se utilizaron fracciones de tejido de branquia, postésófago y recto, de cada grupo. Los tejidos fueron conservados en RNA later[®] Solution (Sigma) y mantenidos a -20°C previo a la extracción de RNA total.

3.3 Extracción de RNA total y Síntesis de cDNA: RT-PCR

Se extrajo RNA total utilizando el protocolo de Matz (2002) y se estandarizó el peso a 80 mg de muestra de cada tejido objetivo (Anexo 3). Para eliminar la presencia de DNA genómico, se utilizó una digestión adicional con DNasa I usando la RNase-free DNase (Qiagen) y para asegurar la mayor pureza posible del RNA, se limpiaron las muestras con RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen). El RNA total se cuantificó utilizando un espectrofotómetro ND 1000 (NanoDrop Technologies) y se determinó la pureza con las razones 260/280 nm y 260/230 nm. La integridad se verificó con electroforesis en gel de agarosa desnaturante al 1.2% con formaldehído y fueron visualizados mediante un fotodocumentador (BioRad modelo Gel Doc XRT Imaging System). Se seleccionaron las muestras que presentaron las siguientes características: relaciones 260/280 > 1.8, 260/230 > 2.0, y las que mejor mostraron integridad.

Posteriormente, se estandarizó la concentración de RNA a 200 ng μL^{-1} haciendo las diluciones correspondientes a las muestras extraídas. La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando 3 μl (0.2 μg μL^{-1}) de RNA de cada organismo siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del kit Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) (Anexo 4).

3.4 Optimización de la RT-PCR.

3.4.1 Determinación de T_m óptima

La temperatura óptima de hibridación (también denominado valor T_m , por sus siglas en inglés, *melting temperature*) para cada uno de los iniciadores fue determinada mediante el equipo Corbett Rotor Gene 6000 (Life Science) (Anexo 5). Se seleccionaron tres temperaturas alrededor de la T_m teórica para cada par de iniciadores usando una muestra de cDNA y DNA de cada tejido (branquia, tracto digestivo y recto) para cada grupo de organismos. Para llevar a cabo las reacciones se utilizó el kit GoTaq® Green Master Mix (Promega), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Anexo 6). Una vez determinada la temperatura óptima de cada iniciador, estos se utilizaron para la RT-PCR, con el objetivo de confirmar la especificidad de la amplificación, mientras que, para verificar el tamaño del amplicón (fragmento de DNA amplificado), se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

3.5 Cuantificación mediante RT-PCR

Hasta el momento se han utilizado dos formas para cuantificar el nivel de expresión de un gen determinado el cual puede realizarse de manera absoluta o relativa. La cuantificación absoluta consiste en relacionar la señal de amplificación obtenida con el contenido de ADN empleando en la curva de calibración; recientemente la mayoría de los trabajos realizados bajo este enfoque utilizan RNA conocido como control externo. Mientras que en la cuantificación relativa se obtiene por el cambio en los niveles de expresión de RNA mensajero (mRNA) determinado como DNA complementario (cDNA, originado por retrotranscripción del mRNA); esta cuantificación se establece con base en la comparación entre el nivel de expresión del gen objetivo y un gen control (también llamado de referencia o normalizador).

En el presente estudio la cuantificación de la expresión de las secuencias (genes) seleccionadas se realizó mediante RT-PCR en términos relativos, con un equipo Corbett Rotor Gene 6000 (Life Science) usando el reactivo SYBR Green I PCR (Qiagen). Para la normalización y cuantificación de todos los genes, las reacciones se efectuaron por duplicado acompañadas de un control sin molde (NTC) para descartar la contaminación de reactivos. Los componentes de la mezcla de reacción fueron: 7.5 μ l de 2x SYBR Green PCR kit, 1.0 μ l de oligonucleótidos (10 μ M), 2.5 μ l de H₂O libre de RNAsas y 3 μ l cDNA (diluido 1:10). La mezcla se incubó durante 3 min a 94°C, seguido por 35 ciclos de 20s a 95°C, 20s a 58°C y finalmente 30s a 72°C. Al finalizar el número de ciclos, se realizó un análisis de la curva de disociación (Melting) de 60 a 95°C con un incremento del 0.5°C de acuerdo con las características del equipo con el fin de determinar la especificidad de los iniciadores. Para la normalización de la expresión de cada gen evaluado, se cuantificó también la expresión de la proteína ribosomal L5 (RPL5) en cada muestra (López-Landavery *et al.*, 2013, documento en preparación). Los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 4. Dos de los 10 productos de RT-PCR (HSP70 y KLF) utilizados en el presente trabajo fueron secuenciados para confirmar el producto amplificado (Anexo 7).

Tabla 3. Secuencias de iniciadores usados para RT-PCR.

Gen	Nombre del iniciador	Secuencias(5´-3´)	Tamaño (pb)
<i>Inmunidad</i>			
KLF ¹	KLF-F	GTCACATGCAGCGGAATTCTAAGG	120
	KLF-R	AAGCTATCCCTAGCGGCCGTTTAT	
MEP ⁶	MEP-F	TTCCAAGGATCCAAAACCTG	93
	MEP-R	TGAACTGCATTGCCTCTTGA	
AbTNF-a ¹	AbTNF-a-F	(GA) ₃ GAATTCATGGCAAAGATTGTTCTGGCTGTGTG	717
	AbTNF-a-R	(GA) ₃ AAGCTTAATCATATATACACCAAAGTAATGCCA	
<i>Proteínas de estrés</i>			
HSP70 ³	HSP70-F	ATGCCAATGGTATCCTC	134
	HSP70-R	GTAATTCTCAGCCTCGTT	
Ferritina ¹	Ferritin-F	ATGGCCCAAACCTCAACCC	516
	Ferritin-R	TCACGTGCGACTATGCC	
HSP90 ⁴	HSP90-F	CACTGTGGACCAGAAATGC	141
	HSP90-R	ACAGCAAAGCACGGAAC	
<i>Antioxidante</i>			
Catalasa ¹	Catalase-F	CTACCTGCAACTTCCCGTCAACT	172
	Catalase-R	AGAGAGCTTGAAAGGGCACTCCAT	
GSTisof1 ²	GSTisof-F	AGCCTATTCGCTGCTGCTGACACA	624
	GSTisof-R	ATTTCTTGATTTTGGGAAGTGCCTC	
SeGPx ¹	SeGPx-F	TATACCGCCACCTGGTGAAAGGAA	152
	SePGx-R	CCACATTGACGATCAGCAGCACAT	
<i>Metabolismo</i>			
Alginasa ⁵	Alginase-F	GATGGACCAACTGCTCTGGT	98
	Alginase-R	CCCCTTTTATGGAGTTGCAG	
<i>Gen Constitutivo</i>			
RPL5 ²	RPL5_F	TCACCAACAAGGACATCATTGTC	151
	RPL5_R	CTAGCTCTGCCTGTCACATACCA	

Referencias: (1) De Zoysa *et al.* 2011. (2) Wan *et al.* 2008. (3) Cheng *et al.* 2007. (4) Zhang *et al.* 2011. (5) Silva-Aciaras *et al.* 2011b. (6) Mah *et al.* 2004.

3.6 Análisis de la expresión relativa

La expresión relativa se estimó a partir del Ct^3 (por sus siglas en inglés, *cycle threshold*, cuya traducción es ciclo umbral) promedio del duplicado de cada gen objetivo, normalizado con el valor promedio de Ct del gen de referencia (RPL5) mediante la fórmula: $2^{-\Delta\Delta [Ct \text{ gen objetivo} - Ct \text{ gen referencia (muestra-calibrador)]}$ (Livak, 2001), que expresa el cambio en el nivel de expresión de la muestra objetivo (no tratada) con respecto a la muestra control (tratada). El valor de Ct es el punto que indica el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral. Cuanto más DNA (o cDNA en el presente experimento) inicial tenga la muestra, el número de ciclos necesarios para alcanzar el valor umbral será menor (Fig. 4). Los resultados se expresaron como la media con su desviación estándar.

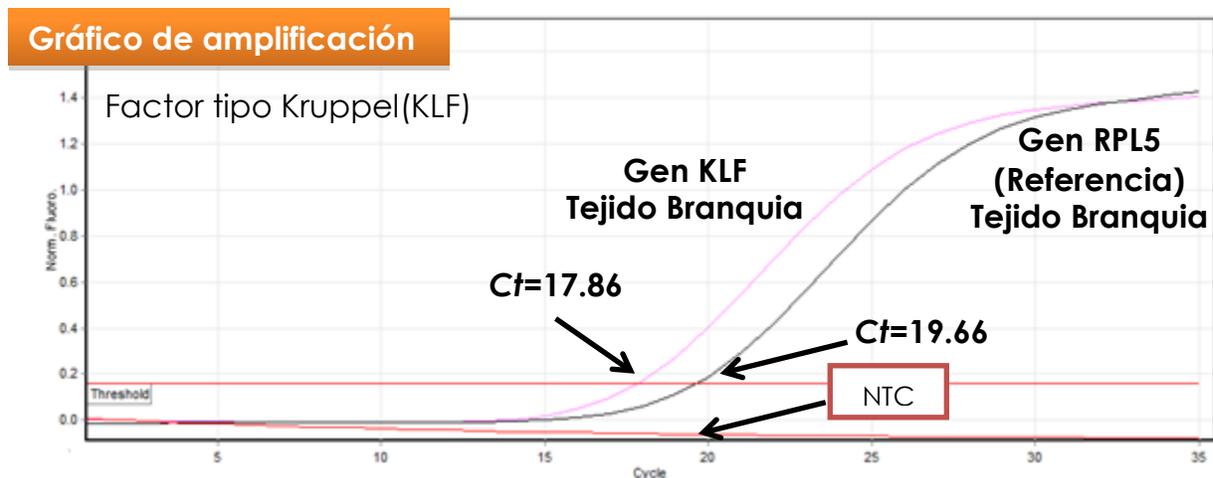


Figura 4. Gráfico de amplificación donde puede verse que el gen objetivo (KLF) supera el umbral más rápido que el gen de referencia (RPL5). El control blanco (NTC) no supera el valor umbral, puesto que no contiene DNA inicial para que se produzca la reacción de amplificación.

³ El punto de intersección de una curva de amplificación con el umbral se denomina Ct (*Threshold Cycle*). A este punto se le ha denominado como el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el valor umbral. Los resultados que se obtienen por RT-PCR están relacionados con la detección y cuantificación de la señal fluorescente emitida por sondas marcadas, durante la reacción de PCR. El nivel de fluorescencia detectado durante la fase exponencial puede ser correlacionado con la cantidad inicial de cDNA o DNA (Walker, 2002).

3.7 Análisis comparativo del nivel de expresión génica

Se realizó un análisis comparativo del nivel de expresión génica en respuesta al SD. Se tomaron muestras de branquia, postesófago y recto, con el fin de determinar el tejido con mayor capacidad transcripcional, así como, el conjunto de enzimas que participa en la misma. Los genes fueron clasificados en tres categorías, con base en sus perfiles de expresión de regulación transcripcional: (1) Regulados positivamente (≥ 2 veces), (2) Regulados negativamente (≤ -2 veces), (3) No hay respuesta (De Zoysa *et al.*, 2011). Los valores por tejido se tabularon y se agruparon utilizando diagramas de Venn (De Zoysa *et al.*, 2011), en los que se consideraron tres conjuntos (en vez de los dos que se suelen utilizar). En estos diagramas se representó a cada conjunto de genes expresados por tejido (tres tejidos) mediante un círculo (Fig. 5). La posición relativa en el plano de tales círculos muestra la relación del número de genes que se están expresando.

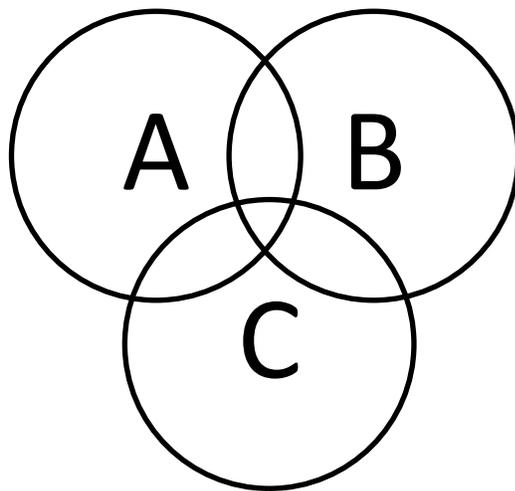


Figura 5. Diagrama de Venn de tres conjuntos A, B y C.

3.8 Diagnóstico por Histología

Para realizar este diagnóstico, se removió el tejido blando de la concha y se realizaron cortes de tal manera que se pudieran observar secciones trasversales del esófago. Cada corte se colocó individualmente en un casete histológico y se fijaron con solución Davidson's, en una relación de volumen de 1:5 (Anexo 8). La fijación duró 24 horas

(Shaw y Battle, 1957). Posteriormente los tejidos se deshidrataron en un procesador automático de tejidos (Leica, Modelo TP1020), con cambios graduales de etanol (70 % hasta alcohol absoluto) (Anexo 9) e incluidos en parafina utilizando un incluidor automático de parafina (Leica, Modelo GG1160).

A partir de cada bloque de parafina se obtuvieron dos cortes histológicos los cuales se realizaron en un micrótopo (Spencer, Modelo 820) a 5 µm de espesor y colocados en un portaobjetos. El primer corte se utilizó para el análisis histológico convencional utilizando la técnica de Hematoxilina-Eosina/Floxina (Shaw y Battle, 1957; Howard *et al.*, 2004) (Anexo 10) montados con resina. Las laminillas histológicas se revisaron en un microscopio compuesto para determinar la presencia y la intensidad de *X. californiensis* en cada abulón. El otro corte fue utilizado para realizar hibridación *in situ* (ISH) como se describe en el apartado 3.11.

Para determinar la intensidad mediante la técnica histológica se consideró el número de inclusiones de bacterias en cada preparación histológica a un aumento de 200x (objetivo 20 X), las cuales se enumeraron usando la escala propuesta por Friedman *et al.* (1997) y modificada por Cáceres-Martínez *et al.* (2001) (Tabla 4).

Tabla 4. Escala de intensidad de PTRs (número de inclusiones de organismos Procariotas del Tipo Rickettsiales).

<i>Nivel</i>	<i>Número de células de PTRs</i>	<i>Interpretación</i>
0	0 PTR	No infectado
1	1 a 10 PTR	Infección ligera
2	11 a 100 PTR	Infección moderada
3	101 a 1000 PTR	Infección severa
4	> 1000 PTR	Infección muy avanzada

Cáceres-Martínez *et al.* (2001, p. 877).

Por otra parte, la prevalencia (PE) fue estimada como el número de abulones infectados (AI) entre el número de abulones examinados (AE) expresado en porcentaje utilizando la siguiente fórmula:

(2)

$$PE(\%) = (AI/AE) \times 100$$

3.9 Extracción de DNA.

La extracción de DNA genómico se realizó según el protocolo de extracción de DNA con sales de Sambrook y Russell (2001) (Anexo 11) utilizando 30 mg de tejido. La pureza y cantidad del DNA se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (Nanotechnologies[®]). La calidad del DNA se evaluó mediante electroforesis por 45 min a 90 V, con amortiguador TAE 1X, en un gel de agarosa al 1% previamente teñido con bromuro de etidio, usando como referencia un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen[®]). Finalmente el gel fue visualizado con un transiluminador de luz UV en un sistema digital de fotodocumentación Ultracam (BioRad[®] modelo Gel Doc XRT Imaging System).

3.10 Diagnóstico por PCR

Se utilizaron los iniciadores RA 5-1 (5'-GTTGAACGTGCCTTCAGTTTAC-3') y RA 3-6 (5'-ACTTGGACTCATTCAAAAGCGGA3') desarrollados para detectar *X. californiensis*, los cuales amplifican específicamente un segmento de 160 pb (Andree *et al.*, 2000). Además complementan el DNA de la subunidad menor del ribosoma y son sensibles y específicos para este patógeno. La amplificación por PCR se realizó en un volumen de reacción estándar de 25 µl con 1.5 mM de MgCl₂, 400 ngml⁻¹ BSA, 200 µM de dNTPs, 0.5 mM de cada iniciador, 0.8 unidades de polimerasa *Taq*, y 100 ng de DNA molde. Las mezclas de reacción se colocaron en un termociclador (Veriti[®] Applied biosystems). El programa para la reacción de amplificación fue: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos a 95°C durante 1 minuto, 62°C durante 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. De cada reacción de PCR se tomó una alícuota para comprobar el producto de amplificación de 160 pares de bases, mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

3.11 Hibridación *in situ* (ISH).

La hibridación *in situ* (ISH, por sus siglas en inglés) se realizó utilizando el protocolo descrito por Antonio *et al.* (1998) (Anexo 12) con una mezcla de volúmenes iguales de cuatro sondas [RA5-1 (5'-GTT-GAA-CGT-GCC-TTC-AGT-TTA-C-3'); RA3-6 (5'-ACT-TGG-ACT-CAT-TCA-AAA-GCG-GA-3'); RA3-8 (5'-CCA-CTG-TGA-GTG-GTT-ATC-

TCC-TG-3' y RA5-6 (5'-GAA-GCA-ATA-TTG-TGA-GAT-AAAGCA-3')] diseñados por Andrée *et al.* (2000) para la detección de *X. californiensis*. Estas sondas se marcaron en el extremo 3' con digoxigenina-11-dUTP (Invitrogen, USA). Las muestras se observaron en un microscopio compuesto. Se utilizaron muestras histológicas como controles positivos y negativos de abulón rojo anteriormente identificadas.

3.12 Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como la media con su desviación estándar, los cuales se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el paquete estadístico *STATISTICA* versión 8.0. Se fijó el nivel de significancia a $P=0.05$. Posteriormente se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey. Para el caso de los datos asignados por categorías en la escala (0-4) fueron normalizados por transformación de raíz cuadrada previo al análisis estadístico de acuerdo a la fórmula utilizada por Moore *et al.* (2009).

(3)

$$x' = \sqrt{(x + 3/8)}$$

Capítulo 4

Resultados

4.1 Niveles de expresión

4.2.1 Expresión génica en branquia

La expresión de 10 genes en branquia fue evaluada usando RT-PCR (Tabla 3). Los perfiles de expresión en branquia indicaron transcripciones alteradas de manera diferente en organismos sintomáticos (SSD) y asintomáticos (ASD). Sin embargo, sólo tres genes KLF, MEP y AbTNF mostraron evidencia de una reducción en el nivel de expresión con respecto a los tratados con oxitetraciclina (LSD). Los genes KLF, MEP y AbTNF mostraron niveles de reducción en SSD: -1.6 y ASD: -4.9, SSD: -18.4 y ASD: -4.6, SSD: -10.4 y ASD: -4.6 veces, respectivamente (Fig. 6). Por otro lado, las proteínas de estrés: HSP70, Ferritina y HSP90 mostraron evidencia de un incremento en el nivel de expresión con SSD: 1.5 y ASD: 1.1, SSD: 4.0 y ASD: 1.9, SSD: 9.2 y ASD: 11.3 veces, respectivamente.

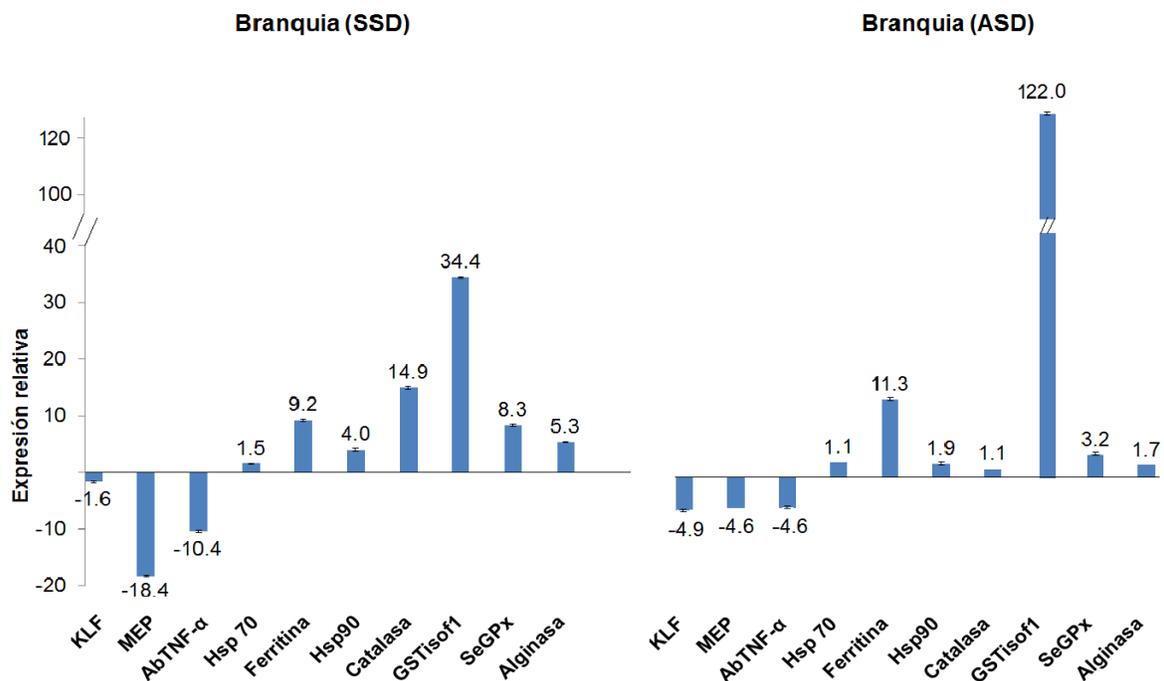


Figura 6. Análisis transcripcional en branquia del abulón rojo *H. rufescens* sintomático (SSD) y asintomático (ASD) al Síndrome de Deshidratación. La magnitud en el cambio en la expresión se calcula por el método ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) usando la Proteína ribosomal L5 (RPL5, por sus siglas en inglés) como gen de referencia. El factor de cambio relativo en la expresión se comparó con el control (LSD, organismos tratados con OTC) (media \pm DE).

Otro grupo de enzimas que mostraron incrementos en el nivel de expresión fueron las antioxidantes: GSTisof, SeGPx y Catalasa con incrementos en el nivel de expresión de SSD: 34.4 y ASD: 122.0, SSD: 8.3 y ASD: 3.2, SSD: 14.9 y ASD: 1.1 veces, respectivamente. Siendo GSTisof1 la que mostró el nivel de expresión más elevado en ambos grupos (SSD y ASD) con respecto a los demás genes evaluados. Por último, la enzima relacionada con el metabolismo, la Alginasa presentó un incremento en el nivel de expresión de SSD: 5.3 y ASD: 1.7 veces, respectivamente (Fig. 6).

4.2.2 Expresión génica en Postesófago

En el postesófago la respuesta transcripcional del gene KLF fue a la baja igual que en branquia, con niveles de reducción de SSD: -1.7, y ASD: -8.0 veces respectivamente. Mientras que los genes AbTNF y MEP mostraron una reducción en el grupo SSD: -1.2 y -1.6 veces, respectivamente, pero hubo un incremento en el grupo ASD: 2.6 veces, para cada gen. En el caso de las proteínas de estrés: HSP90 y Ferritina se observó un incremento en el nivel de expresión SSD: 3.0 y ASD: 2.8, SSD: 1.9 y ASD: 1.1, respectivamente. Mientras que la HSP70 muestra un incremento en la expresión en el grupo SSD: 2.2 veces, y una reducción en ASD: -3.2 veces. Por otra parte, la enzima antioxidante "GST" mostró los mayores incrementos en el nivel de expresión con: SSD: 55.7 y ASD: 128.0 veces. Catalasa y SeGPx mostraron evidencia de incrementos en el nivel de expresión únicamente en el grupo SSD con 1.3 y 1.5, caso contrario para el grupo ASD, que indica una reducción en el nivel de expresión con -3.7 y -190.1 veces, respectivamente. Siendo SeGPx el que mostró la mayor reducción transcripcional. La Alginasa tuvo el mayor incremento en el nivel de expresión (36.8) en el grupo ASD, que en el grupo SSD con 5.6 veces (Fig. 7), lo que sugiere una mayor presencia de esta enzima en los organismos que no presentan síntomas del SD.

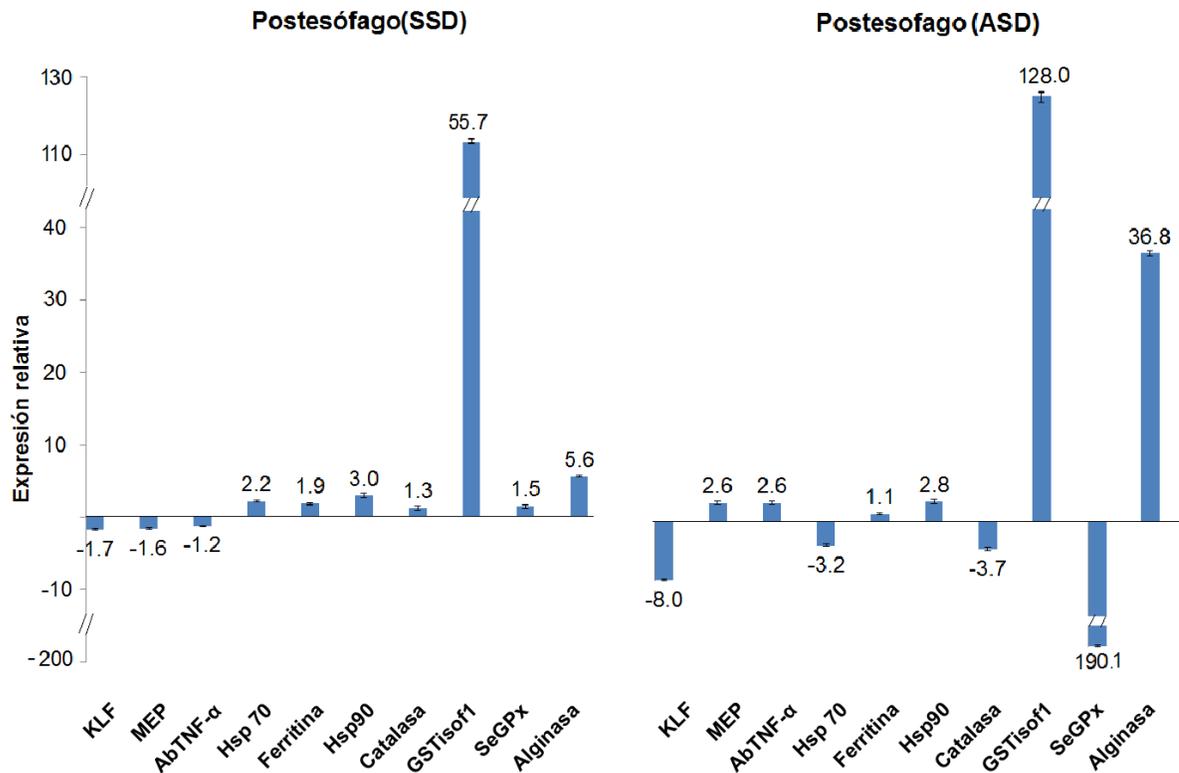


Figura. 7. Análisis transcripcional en postesófago del abulón rojo *H. rufescens* sintomático (SSD) y asintomático (ASD) al Síndrome de Deshidratación. La magnitud en el cambio en la expresión se calcula por el método ($2^{-\Delta\Delta CT}$) usando la Proteína ribosomal L5 como gen de referencia. El factor de cambio relativo en la expresión se comparó con la del control (LSD, organismos tratados con OTC) (media \pm DE).

4.2.3 Expresión génica en Recto

Los niveles de expresión en recto indican algo diferente a lo obtenido con los demás tejidos, ya que los genes KLF y MEP presentan un incremento en el nivel de expresión: SSD: 1.3 y ASD: 1.1; SSD: 1.0 y ASD: 2.4 veces, respectivamente. Mientras que AbTNF- α mostró una reducción en el nivel de expresión con magnitud de SSD: -3.1 y un aumento en ASD: 2.4 veces. Las proteínas de estrés HSP90 y Ferritina mostraron un incremento de SSD: 2.2 y ASD: 2.3; SSD: 2.0 y ASD: 1.2 veces. Mientras que HSP70 mostró un incremento en el nivel de expresión de SSD: 1.4 y disminuyó en ASD: -1.6 veces. La enzima antioxidante GST mostró el mayor incremento en el nivel de expresión en ambos grupos (SSD: 19.7 y ASD: 84.4, veces). La SeGPx mostró igualmente incrementos en ambos grupos (SSD: 1.6 y ASD: 2.7, veces), mientras que, la catalasa presentó una reducción en el nivel de expresión (SSD: -1.0 y ASD: -17.5,

veces). Por último, el nivel de expresión de la Alginasa disminuyó -1.0 veces en el grupo SSD y presentó un incremento de 8.6 veces en ASD (Fig. 8).

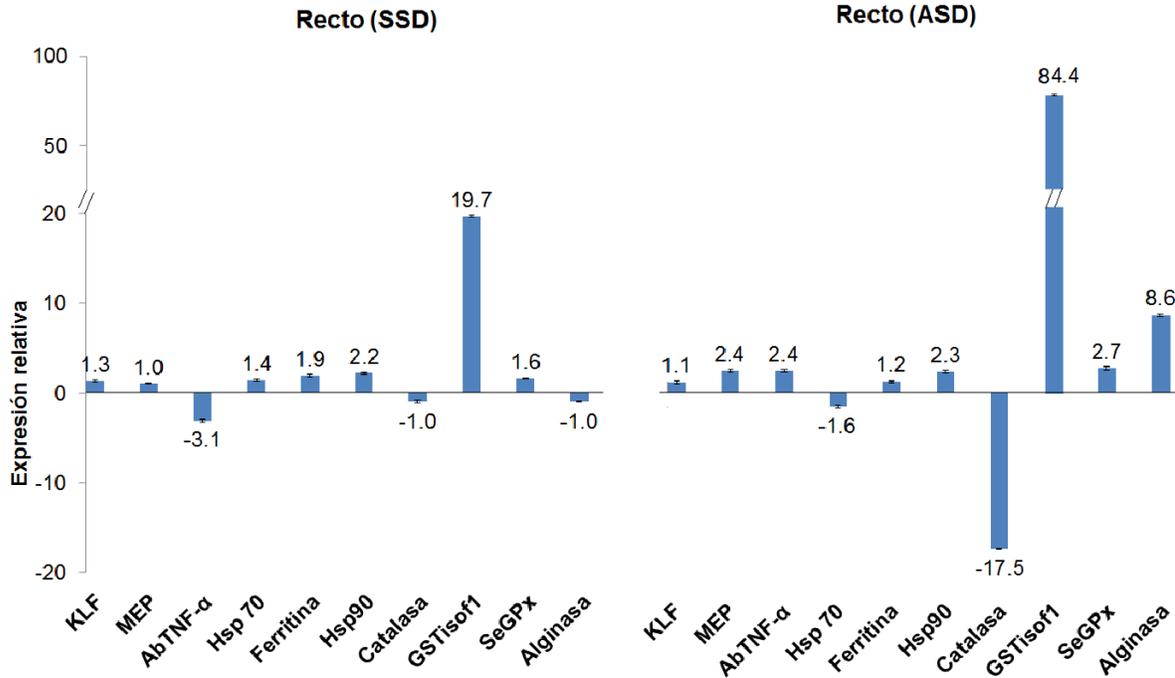


Figura. 8. Análisis transcripcional en recto del abulón rojo *H. rufescens* sintomático (SSD) y asintomático (ASD) al Síndrome de Deshidratación. La magnitud en el cambio en la expresión se calcula por el método ($2^{-\Delta\Delta CT}$) usando la Proteína ribosomal L5 como gen de referencia. El factor de cambio relativo en la expresión se comparó con la del control (LSD, organismos tratados con OTC) (media \pm DE).

4.2.4 Análisis comparativo del nivel de expresión génica.

En branquia los genes de las enzimas Ferritina, HSP90, GSTisof1, SeGPx, Catalasa y Alginasa fueron regulados positivamente en ambos grupos (SSD y ASD), la diferencia entre cada grupo fue en el nivel de expresión. Por otro lado, MEP, AbTNF- α y KLF fueron regulados negativamente (Tabla 5). En postesófago, HSP90, GSTisof1 y Alginasa fueron regulados positivamente en ambos grupos (SSD y ASD), mientras que HSP70 y Ferritina sólo fueron regulados positivamente en SSD; MEP y AbTNF- α en ASD. En este caso el grupo SSD no mostró regulación negativa, pero el grupo ASD mostró cuatro: KLF, HSP70, Catalasa y SeGPx. Las regulaciones negativas más altas se obtuvieron en KLF y SeGPx (Tabla 5).

En el recto, en el grupo SSD se regularon positivamente tres enzimas (Ferritina, GSTisof1 y HSP90), mientras que solo AbTNF- α fue regulada negativamente. En ASD fueron reguladas seis enzimas y solamente Catalasa fue regulada negativamente (Tabla 5). La comparación de los resultados reveló que los genes antioxidantes, inmunes, proteínas de estrés y metabólica en abulón respondieron de manera diferente en los tres tejidos evaluados (branquia, postesófago y recto), y en los dos grupos SSD y ASD. Entre todos los genes seleccionados, GSTisof1 mostró los mayores niveles de expresión por grupo y tejido, con los mayores niveles de expresión en Postesófago (SSD: 55.8 y ASD 128.0 veces, respectivamente). Se presentaron genes pertenecientes a una “falta de respuesta”, lo que sugiere que estos genes no son sensibles a alguna forma de estrés biológico creado por *X. californiensis* en el abulón rojo (Tabla 5).

Con el fin de conocer el número de genes que son inducidos por el SD para cada tejido (Branquia, Postesófago y Recto), y conocer los niveles de expresión, se realizó un diagrama de tres conjuntos o diagrama de Venn (Fig. 9).

En el grupo SSD se mostró la interacción activa de cuatro genes uno de ellos fue la Alginasa que únicamente se expresó en dos tejidos (branquia y postesófago), mientras que los otros tres genes (Ferritina, HSP90 y GSTisof1) se expresaron en los tres tejidos. Por otro lado, el grupo ASD se caracterizó por una interacción intertejidos más amplia, resaltando la expresión de la Alginasa, HSP90 y GSTisof1 en los tres tejidos. Además, de la participación de la enzima SeGPx en dos tejidos (branquia y recto), y por último la expresión de dos genes exclusivos de este grupo (ASD): La citoquina AbTNF- α y la proteína MEP.

Tabla 5. Respuestas transcripcionales para los grupos SSD y ASD en branquias, postesófago y recto, utilizando como referencia al grupo LSD.

Respuesta transcripcional	Organismos sintomáticos (SSD)			Organismos asintomáticos (ASD)		
	Branquia	Postesófago	Recto	Branquia	Postesófago	Recto
Regulación positiva	<u>GSTisof1</u> (34.4 veces),	<u>GSTisof1</u> (55.7 veces),	<u>GSTiso1</u> (19.7 veces),	<u>GSTisof1</u> (122.0 veces),	<u>GSTisof1</u> (128 veces),	<u>GSTisof1</u> (84.4 veces)
	<u>Catalasa</u> (14.9 veces),	<u>Alginasa</u> (5.6 veces),	<u>HSP90</u> (2.2 veces),	<u>Ferritina</u> (11.3 veces),	<u>Alginasa</u> (36.8 veces)	<u>Alginasa</u> (8.6 veces)
	<u>Ferritina</u> (9.2 veces),	<u>HSP90</u> (3.0 veces)	<u>Ferritina</u> (2.0 veces),	<u>SeGPx</u> (3.2 veces),	<u>HSP90</u> (2.8 veces),	<u>SeGPx</u> (2.7 veces),
	<u>SeGPx</u> (8.3 veces),	<u>HSP70</u> (2.2 veces),		<u>HSP70</u> (2.1 veces),	<u>MEP</u> (2.6 veces),	<u>MEP</u> (2.4 veces),
	<u>Alginasa</u> (5.3 veces)	<u>Ferritina</u> (2.0 veces),		<u>HSP90</u> (2.0 veces),	<u>AbTNF-α</u> (2.6 veces),	<u>AbTNF-α</u> (2.4 veces),
	<u>HSP90</u> (4.0 veces),			<u>Alginasa</u> (2.0 veces)		<u>HSP90</u> (2.3 veces),
Regulación negativa	<u>AbTNF-α</u> (10.4 veces),		<u>AbTNF-α</u> (3.1 veces)	<u>MEP</u> (4.6 veces)	<u>HSP70</u> (3.2 veces),	<u>Catalasa</u> (17.5 veces),
	<u>MEP</u> (18.4 veces),			<u>AbTNF-α</u> (4.6 veces),	<u>Catalasa</u> (3.7 veces),	
				<u>KLF</u> (4.9 veces)	<u>KLF</u> (8.0 veces),	
					<u>SeGPx</u> (190.1 veces)	
No hay respuesta	<u>KLF</u> (-1.6 veces),	<u>SeGPx</u> (1.5 veces),	<u>SeGPx</u> (1.6 veces),	<u>Catalasa</u> (1.1 veces),	<u>Ferritina</u> (1.1 veces),	<u>Ferritina</u> (1.2 veces),
	<u>HSP70</u> (-1.5 veces),	<u>Catalasa</u> (1.3 veces),	<u>HSP70</u> (1.4 veces),			<u>KLF</u> (1.1 veces),
		<u>AbTNF-α</u> (-1.2 veces),	<u>KLF</u> (1.3 veces),			<u>HSP70</u> (-1.6 veces),
		<u>MEP</u> (-1.6 veces),	<u>MEP</u> (1.0 veces),			
		<u>KLF</u> (-1.7 veces),	<u>Catalasa</u> (-1.0 veces),			
			<u>Alginasa</u> (-1.0 veces),			

La magnitud en el cambio en la expresión se calcula por el método ($2^{-\Delta\Delta CT}$) usando la Proteína ribosomal L5 (RPL5) como gen de referencia. El factor de cambio relativo en la expresión se comparó con la del control (LSD, organismos tratados con OTC). La expresión de los genes en el tejido se normalizó tomando en cuenta el nivel de expresión (expresión ≥ 2 significa regulados positivamente mientras que ≤ -2 significa regulados negativamente; los valores de expresión fuera de este rango se consideraron como falta de respuesta).

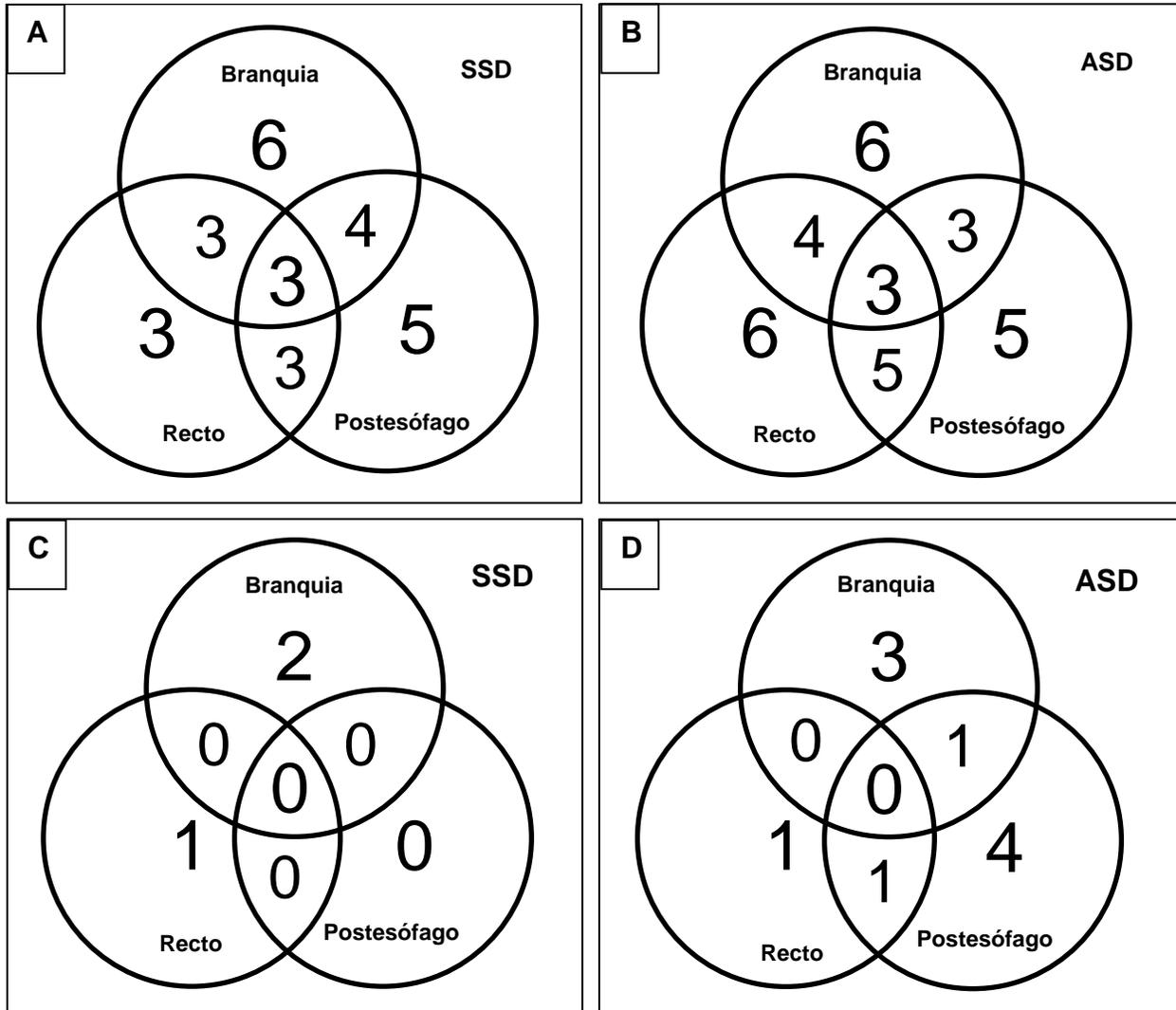


Figura 9. Diagramas de Venn mostrando el número de genes expresados diferencialmente por tejido (branquia, postesófago y recto), con referencia a LSD. A) (≥ 2 veces) Regulados positivamente en organismos sintomáticos al SD (SSD), B) (≥ 2 veces) Regulados positivamente en organismos asintomáticos al SD (ASD). C) (≤ -2 veces) Regulados negativamente en organismos sintomáticos al SD (SSD). D) (≤ -2 veces) Regulados negativamente en organismos asintomáticos al SD (ASD).

4.3 Prevalencia e Intensidad del síndrome de deshidratación (SD)

4.3.1 Análisis histológico y diagnóstico por PCR tiempo final.

Los PTR se encontraron en todos los abulones tanto en los que mostraron los signos a SD como en los que no los presentaban (Prevalencia del 100%) con una intensidad que va de moderada a severa. El valor promedio de la intensidad fue de 1.87 ± 0.09 y

1.58±0.10 respectivamente. Mostrando diferencias significativas ($P<0.05$) entre ambos grupos, mientras que en el grupo control (LSD) no fue detectado (Tabla 6).

Todos los indicadores del estado de salud (intensidad, prevalencia, índice de condición, contracción del manto e hipertrofia celular en glándula digestiva (GD) mostraron un patrón relativo de la condición de los organismos para cada grupo. De acuerdo con el presente estudio, mientras menos evidente son los signos de la enfermedad los organismos mostraban una mejor condición de salud. Encontrándose efectos significativos en la condición aparente del estado de salud de los organismos con y sin signos al SD (Tabla 6).

Tabla 6. Prevalencia e intensidad de la infección por el síndrome de deshidratación, índice de condición y signos al SD.

	Con signos a SD (SSD)	Sin signos a SD (ASD)	Libre de SD (LSD)
(%) Positivo a <i>X. californiensis</i>	100	100	ND
Intensidad por <i>X. californiensis</i>	1.87 (0.09) ^a	1.58(0.10) ^b	ND
Índice de condición (IC)	0.89 (0.162) ^a	1.18(0.156) ^b	1.24(0.163) ^b
<i>Signos a SD</i>			
Contracción del manto	1.63 (0.14) ^a	0.67 (0.17) ^b	0.65(0.14) ^b
Hipertrofia celular GD	1.47 (0.15) ^a	0.84(0.29) ^b	0.61(0.0) ^c

Letras distintas marcan diferencia significativa ($P<0.05$) por indicador (fila); ND=no detectado. (Media ± DE) para cada grupo. GD: glándula digestiva.

El análisis histopatológico del abulón rojo *H. rufescens* afectado por el síndrome de deshidratación mostró diferentes grados de lesión. En la Figura 10 A y B se observa una sección transversal del tracto digestivo que muestra una infección muy avanzada (+4), observándose la abundancia de colonias de PTR que adquieren una forma basófilo muy intensa, además la mayor parte de las células infectadas son hipertróficas (Fig. 10 A). Además, varias células infectadas se observaron rotas y las colonias bacterianas fueron expulsadas hacia el lumen del tracto digestivo (Fig. 10 B). En las Figuras 10 C y D se muestra una infección moderada (+2), observándose focos mínimos de infección por PTRS; sin embargo, las células infectadas son hipertróficas. En la Figura 10 C se pueden observar varios hemocitos en el tejido conectivo

subepitelial. Otra de las características que se pudo observar en ambos grados de lesión, fue la proliferación de células mucosas, que en ocasiones cuando el individuo se expone a algún contaminante o estresor, la proliferación de este tipo celular es un mecanismo de defensa, que intensifican la producción de mucus y protege del estresor.

En los organismos tratados con OTC no se detectaron inclusiones de PTRs (Fig. 10 E y F) confirmando que la OTC elimina a *X. californiensis*.

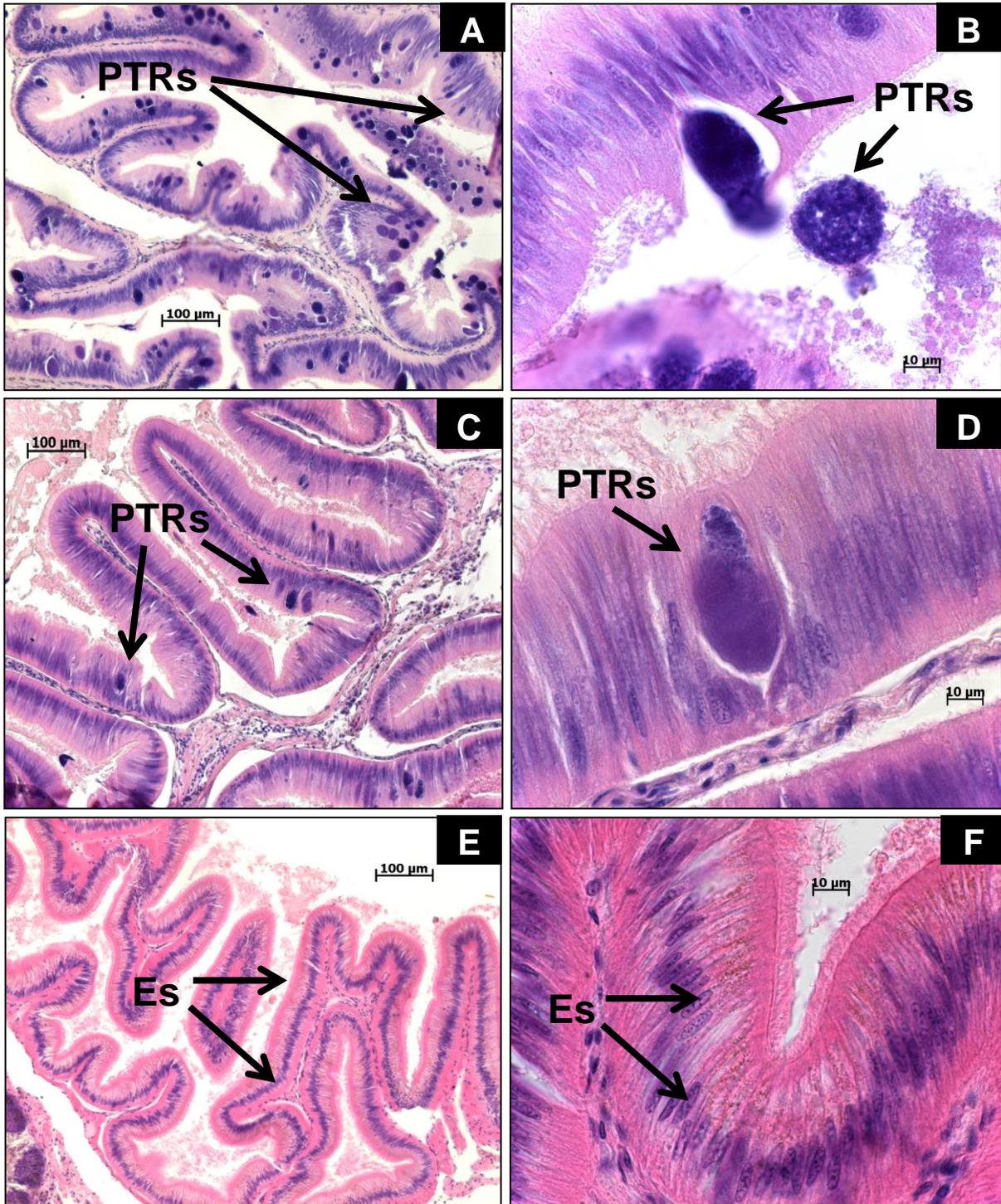


Figura 10. Imágenes que muestran a *Haliotis rufescens* infectado con *Xenohaliotis californiensis*. En A) Esófago posterior de abulón rojo severamente infectado (+4) por organismos procariotas del tipo Rickettsiales (PTRs). (B) Colonias bacterianas desprendidas en el lumen del intestino. (C) Divertículos digestivos de abulón rojo moderadamente infectado (+2) por PTRs; sin embargo, las células infectadas son hipertróficas (D) Célula epitelial infectada por PTRs. (E y F) Epitelio del esófago no infectado por la rickettsias (Es).

4.3.2 Detección de *X. californiensis* PCR tiempo final.

Se llevó a cabo la amplificación de la región hipervariable 1 del gen 16S ribosomal (Andree *et al.*, 2000) de *X. californiensis* en 15 organismos (abulón rojo *H. rufescens*). Se obtuvo un tamaño de fragmento de 160 pb (Fig. 11) en muestras de DNA. La eficiencia de la PCR fue del 93.3%.

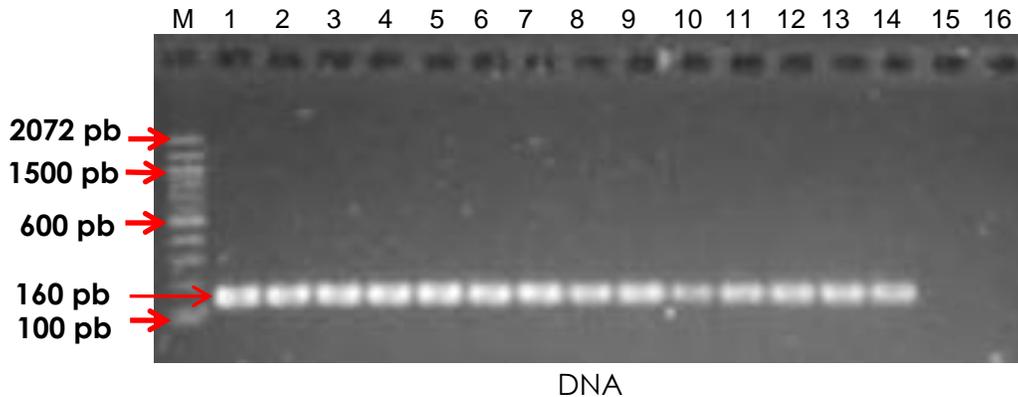


Figura 11. Detección de *Xenohaliotis californiensis* en *Haliotis rufescens* por PCR con el uso de oligonucleótidos de la región hipervariable V1 16S ribosomal. 1-14) Muestras positivas de *X. californiensis*, 1) Control positivo (ADN genómico de *X. californiensis*, 15) Muestra negativa, 16) Control negativo (agua estéril). M) Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

4.3.3 Confirmación de la identidad de *X. californiensis* por hibridación ISH.

Se confirmó la presencia de PTRs correspondientes a *X. californiensis* por ISH en organismos que fueron positivo por histología (Fig. 12).

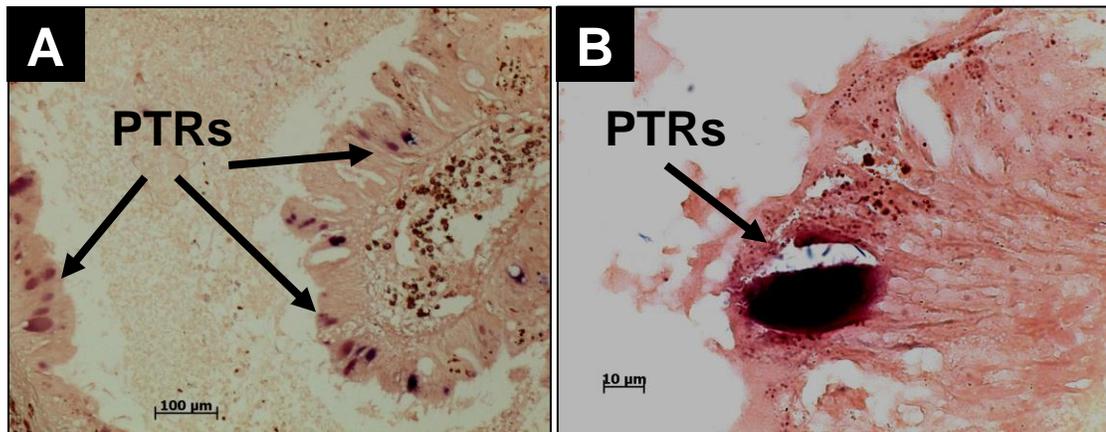


Figura 12. (A y B) Detección de PTRs en una sección de epitelio del esófago en *H. rufescens* por Hibridación *in situ*.

Capítulo 5

Discusión, Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Discusión

El síndrome de deshidratación (SD) es una enfermedad crónica causada por *Xenohaliotis californiensis*, una bacteria Procariota del Tipo Rickettsiales (PTR), que afecta a diversas especies de abulón en condiciones de cultivo y silvestres (Haaker *et al.*, 1992; Friedman *et al.*, 2000). A pesar del aumento de los eventos de mortalidad de abulones por esta enfermedad (Friedman, 2012) existe muy poca información disponible sobre los efectos del SD en la respuesta inmune protectora a nivel molecular en abulones sintomáticos del SD. El poder detectar el nivel de expresión transcripcional de cada gen permitirá tener una mejor idea acerca del tipo de interacciones inmunes en el huésped y puede ayudar a proporcionar las bases para identificar las vías de activación inmune en el abulón (Dhiman *et al.*, 2001). Es por esta razón, que en el presente estudio se analizaron los patrones de expresión génica de abulones sintomáticos y asintomáticos al síndrome de deshidratación (SD), con el fin de conocer los perfiles transcripcionales que proporcionen una mejor comprensión del sistema inmune del abulón. Este tipo de respuesta celular tiene un costo energético, por lo cual, el estado de salud del huésped es fundamental y se evidencia en una mejor respuesta a organismos patógenos y a diferentes estresores (Villena *et al.*, 2003). En este estudio se observó que el SD podría afectar negativamente la actividad digestiva de *H. rufescens* y con ello estar afectando el consumo de energía, ya que los niveles de expresión de Alginasa disminuyeron en SSD observándose una correlación directa con el grado de infección. Estos resultados son respaldados con los obtenidos por González *et al.* (2012), en donde, puntualiza que en organismos afectados por el SD las funciones fuertemente afectadas son la tasa de alimentación, el metabolismo estándar, y la producción de heces. El uso de la energía puede variar según las condiciones de salud del organismo en un momento dado. De acuerdo con esto, la infección causada por *X. californiensis* podría causar alteraciones en las funciones fisiológicas del abulón rojo a través de dos vías: (1) por causa directa de las alteraciones en los tejidos digestivos, lo que afectaría las funciones digestivas y, como consecuencia, la disminución de la

incorporación de la energía para funciones vitales como: crecimiento, reproducción, y mantenimiento, lo que se observa en todos los casos donde la enfermedad es avanzada, como consecuencia de la ruptura del epitelio e hipertrofia celular que presenta la glándula digestiva, y (2) a través de la generación de un estado de estrés que altera las funciones fisiológicas o de comportamiento (por ejemplo, la alimentación). Debido a que las bacterias residen dentro de las células del tracto digestivo es probable que las funciones afectadas principalmente estén asociadas con capacidades digestivas. Las infecciones bacterianas generan cambios en el funcionamiento del sistema inmune e inducen la respuesta del huésped por la activación de efectores en respuesta a su estímulo (Silva-Aciaras *et al.*, 2013). Genes específicamente expresados bajo una infección patógena específica podrían ser utilizados como marcadores de la infección (Matsuyama *et al.*, 2007). En el presente estudio se utilizaron genes relacionados con inmunidad (AbTNF- α , MEP, KLF), antioxidantes (GSTisof1, Catalasa, SeGPx) proteínas de estrés (Ferritina, HSP90, HSP70) y una enzima metabólica (Alginasa) para analizar los niveles de expresión en organismos sintomáticos (SSD) y asintomáticos (ASD) al SD. La citoquina AbTNF- α induce una variedad de vías biológicas, tales como la defensa antioxidante, la apoptosis y regulación de otras citoquinas en el abulón. Asimismo, todos estos genes están interrelacionados y pueden mantener un eficiente sistema inmunológico. Sin embargo, el mecanismo molecular implicado en estas actividades requiere de mayor investigación (Silva-Aciaras *et al.*, 2013). En el presente estudio la expresión del gen AbTNF- α fue regulado negativamente en los tres tejidos analizados (Branquia, Postesófago y Recto) en el grupo SSD. Mientras, que por otro lado, en el grupo ASD fue expresado positivamente en postesófago y recto, mostrando una participación muy activa principalmente en este grupo. La expresión de citoquinina AbTNF- α exclusivamente en este grupo explica el mismo comportamiento mostrado por la proteína de expresión de macrófagos (MEP), ya que AbTNF- α está involucrada en el sistema inflamatorio producido principalmente por macrófagos activos, en la expresión de moléculas de adhesión endotelial, participando en la activación, proliferación, diferenciación y migración de células inmunocompetentes (Casadevall *et al.*, 2009). En estudios con *H. diversicolor* (Wang *et al.*, 2008a) y *H. discus discus* (De Zoysa *et al.*, 2011) se muestra que AbTNF- α es expresada positivamente en branquias y tracto digestivo hasta las 48 horas después de la

exposición a vibrios, sugiriendo que la participación de esta citoquina podría generar un retraso en el desarrollo de la enfermedad en el abulón. Por otra parte, la proteína MEP tiene un papel importante en la eliminación y muerte bacteriana en abulones rojos y amarillos (Mah *et al.*, 2004). Se sugiere que el aumento de la expresión de MEP depende de la concentración de bacterias que tiene el tejido infectado (Wang *et al.*, 2008b). Sin embargo, en el presente estudio se observó un efecto contrario con una caída en la expresión de MEP correspondiente a un aumento de la concentración de bacterias en el tejido infectado. Cuando se compararon los niveles de expresión génica entre SSD y ASD, fue evidente el incremento de MEP en el grupo ASD especialmente el postesófago y recto. Lo que podría explicarse en parte por la ineficiencia en el proceso de eliminación de bacterias patógenas en animales que son más susceptibles y a punto de morir, como es el caso del grupo SSD en donde la infección por *X. californiensis* era muy avanzada. El gen KLF es un factor de transcripción que ejerce funciones reguladoras importantes en muchos procesos biológicos, tales como el crecimiento, el desarrollo, la diferenciación y la apoptosis. KLF mostró regulaciones negativas en branquia y postesófago en ambos grupos de organismos (SSD y ASD), mientras que en recto mostraron regulaciones positivas. Parte del complejo sistema de defensa la fagocitosis es otro de los mecanismos inmunes importantes en los invertebrados durante la infección microbiana que conduce a una producción excesiva de especies oxígeno reactivas (ROS) para eliminar o inactivar a los invasores extraños (Roch, 1999). Por lo tanto, las enzimas antioxidantes (GSTisof1, Catalasa, SeGPx) representan colectivamente un sistema de defensa antioxidante en abulón minimizando el daño ocasionado por el estrés oxidativo, así como regular el funcionamiento adecuado de las reacciones inmunes (De Zoysa *et al.*, 2011). Se ha sugerido que diversas respuestas al estrés oxidativo podrían estar relacionadas con la capacidad metabólica de los tejidos, así como el contenido de antioxidantes (Limón-Pacheco *et al.*, 2009). Las branquias (en moluscos) requieren un sistema de defensa antioxidante eficaz, ya que la transferencia de oxígeno se produce en la superficie de éstas (Box *et al.*, 2009; Regoli *et al.*, 1997) con lo que podría tener un potencial mayor para acumular excesivamente ROS. Además, las branquias están en contacto continuo con el agua, y podrían infectarse fácilmente con cualquier microorganismo patógeno del ambiente circundante. En el presente estudio, en branquia y postesófago se observaron los

valores más altos de expresión, participando principalmente la enzima GSTisof1, la cual, tuvo una respuesta positiva a la infección causada por *X. californiensis* tanto en los tejidos externos (branquias), así como en los internos (postesófago) en el abulón rojo. Esto puede sugerir que los abulones asintomáticos al SD producen enzimas antioxidantes como respuesta a la enfermedad crónica causada por la infección con *X. californiensis*.

Las Glutación- S-transferasas (GSTisof1) son una familia bien caracterizada de isoenzimas multifuncionales que están ubicuamente distribuidos en bacterias, plantas y animales (Blanchette *et al.*, 2007). La función primaria de las GST es defensa celular contra la toxicidad inducida por compuestos lipófilos xenobióticos. Las GSTs también tienen un papel prominente en muchos otros procesos fisiológicos, incluyendo resistencia a estrés oxidativo (Ding *et al.*, 2005), en el transporte endógeno de compuestos hidrófobos (Salinas *et al.*, 1999), catalizando reacciones biosintéticas (Jowsey *et al.*, 2001) y actúan como moléculas de señalización (Cho *et al.*, 2001). Los genes o proteínas de GST se identifican en algunos moluscos marinos como el calamar (*Ommastrephes sloani pacificus*) (Tomarev *et al.*, 1993), el mejillón (*Mytilus edulis*) (Fitzpatrick *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2004), la almeja (*Mercenaria mercenaria*) (Blanchette *et al.*, 1999), el mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) (Hoarau *et al.*, 2006) y el abulón disco (*H. discus discus*) (Wan *et al.*, 2008).

Las GSTs tienen un papel importante en la defensa celular contra la toxicidad inducida químicamente y en la actualidad hay pocos estudios en moluscos marinos sobre la respuesta de las GSTs contra infecciones bacterianas (Dubovsky *et al.*, 2008). El único trabajo es de Hong-Lin *et al.* (2009), donde después de la exposición bacteriana, la GST se expresa significativamente en hemocitos, branquias, manto y glándula digestiva. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, ya que GSTisof1 fue regulada positivamente en ambos grupos (SSD y ASD) y en los tres tejidos anteriormente mencionados. La GSTisof1 mostró los mayores niveles de expresión de los 10 genes evaluados. La mayor respuesta se obtuvo en postesófago del grupo ASD. Una vez más, se observó una menor expresión de la enzima GSTisof1 en el grupo SSD lo que podría ser debido al débil estado fisiológico de los animales. Una vez confirmada la importante participación de GSTisof1 en la respuesta

inmune, se abre la puerta para la realización de estudios específicos sobre las posibles interacciones entre las reacciones inmunitarias y de biotransformación.

Otro gen evaluado fue el de la enzima SeGPx que mostró niveles de regulación positiva. Los mayores niveles de expresión fueron en branquia y recto (SSD y ASD), mientras que en el grupo ASD, únicamente en postesófago se mostró regulación negativa. Por otro lado, el gen de la Catalasa mostró regulación positiva únicamente en branquias (SSD y ASD). Entre las enzimas antioxidantes, la GSTisof1 y SeGPx exhiben un incremento notable de la transcripción de sus genes en presencia de las bacterias responsables del SD, lo que sugiere que tienen un uso potencial como marcador inmunológico de infección patógena. Por otra parte, para equilibrar el exceso de ROS, los abulones utilizan enzimas antioxidantes para reducir el estrés oxidativo causado por la presencia de patógenos (De Zoysa *et al.*, 2011).

En respuesta a la presencia del SD la expresión de genes relacionados con la síntesis de diversas proteínas de estrés también se mostró alterada. Durante una infección, las células huésped regulan la disponibilidad de hierro (Doherty, 2007), la presencia de los cuales es esencial para la proliferación de vibrios (Wyckoff *et al.*, 2007; Ratledge, 2007). Se considera que la Ferritina es clave en los procesos de desintoxicación y es la proteína de almacenamiento y regulación de hierro más importante, al contribuir en la homeostasis celular y de defensa en invertebrados (Recalcati *et al.*, 2008), así como la reactivación de la producción de ROS (Salinas-Clarot *et al.*, 2011). En nuestro estudio, la Ferritina presentó los mayores niveles de expresión en branquia en ambos grupos, pero con un mayor incremento en organismos ASD. Otros resultados en *H. rufescens* (Silva-Aciaras *et al.*, 2013) y *H. tuberculata* (Travers *et al.*, 2010) expuestos a vibrios, muestran que, bajo un fuerte estrés bacteriano, la expresión de Ferritina disminuye debido a una alteración fisiológica del organismo para una supuesta fijación de hierro y un posterior aumento de la susceptibilidad a organismos patógenos. Es importante mencionar que en estos últimos trabajos las exposiciones a vibrios y a otros patógenos se realizaron como desafíos a corto plazo (evaluados en no más de cinco días), por el simple hecho de que las enfermedades a estudiar son agudas (enfermedades que se desarrollan en un período relativamente corto), mientras que en el presente trabajo, la expresión de los diferentes genes fue evaluada en organismos que ya estaban

infectados con *X. californiensis*, lo que pudo haber influido en la diferencia observada en la expresión de los distintos genes en abulón rojo con respecto a los estudios de Travers *et al.* (2010), De Zoysa *et al.* (2011) y Silva-Aciares *et al.* (2013) entre otros.

Para el caso de estrés infeccioso, otro grupo que participa activamente son las HSPs ayudando en la eliminación de células dañadas (Schlesinger, 1990). Se han implicado a las proteínas de choque térmico (HSPs) en la respuesta al estrés ocasionado por infecciones bacterianas (Mebrahtu *et al.*, 2010). En el presente estudio, los genes de las HSPs tales como HSP70 y HSP90 fueron regulados diferencialmente en SSD y ASD. La HSP90 fue regulada positivamente en los dos grupos, anteriormente mencionados, con un mayor incremento en el nivel de expresión en los SSD, principalmente en branquia. En el grupo ASD el nivel de expresión de HSP90 fue constante en los tres tejidos (branquia, postesófago y recto), mientras que la HSP70, mostró regulación positiva en SSD y negativa en ASD especialmente en postesófago y recto. La HSP70 se expresó mayormente en postesófago (SSD) y en branquia (ASD). La expresión diferencial sugiere que las HSPs pueden desempeñar un papel inmune como en otros organismos. De acuerdo con Mebrahtu *et al.* (2010) la almeja *Mya arenaria* expuesta a bacterias, regula significativamente a la enzima HSP90 después de un desafío bacteriano. Además, homólogos de las HSPs tales como HSP70, HSP90 y HSP40 se han reportado en otras especies de moluscos expuestos a bacterias (Gestal *et al.*, 2007; Perriguault *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008a y 2008b) lo que sugiere su implicación en la defensa inmune. En este estudio, la participación de HSP 90 parece ser más activa que la HSP70, especialmente en organismos sintomáticos al SD (SSD). Caso contrario a lo reportado en el abulón *H. diversicolor* en donde HSP70 parece ser más activa en respuesta a desafíos bacterianos (Wang *et al.*, 2008a). Es importante mencionar que la regulación molecular de estas enzimas en el caso del abulón *H. tuberculata* desafiado con vibrios, sólo se han observado en los primeros días y en los últimos días de la infección, lo que puede sugerir una secuencia en la expresión de las HSPs en individuos resistentes, proporcionando una nueva pista de los mecanismos moleculares asociados con la resistencia en abulón (Travers *et al.*, 2010). En el presente estudio, la evaluación del nivel de expresión de estas enzimas, se realizó en organismos posiblemente infectados hace meses con *X. californiensis*, por lo tanto, es

necesario en el futuro realizar una infección experimental, evaluando en el tiempo los niveles de expresión génica hasta detectar el momento en que son alterados por la infección con el fin de confirmar si existe una secuencia en el nivel de expresión como lo sugiere Travers *et al.* (2010).

Por otro lado, todas las respuestas a un estrés celular tienen un coste energético, que se refleja en la expresión diferencial de varios genes relacionados con el metabolismo digestivo y energético. Los estudios realizados en otras especies de abulón (*H. tuberculata* y *H. diversicolor*) mostraron una disminución en la expresión de los genes relacionados con el metabolismo celular y la energía en animales susceptibles a infecciones bacterianas, por el contrario, en organismos resistentes se presentó un aumento en la expresión, lo que sugiere una fuerte relación entre energía consumida y la resistencia a patógenos externos (Wang *et al.*, 2008a; Travers *et al.*, 2010). En abulón rojo del presente estudio, la expresión del gen de la enzima Alginasa relacionado con el metabolismo digestivo estuvo acorde con los resultados antes mencionados. La expresión de la Alginasa en el grupo ASD mostró un mayor incremento en comparación a los SSD. La Alginasa pertenece a la familia de enzimas conocidas como liasas carbono-oxígeno que actúan sobre polisacáridos (distribuidos ampliamente en las paredes celulares de las algas marinas pardas) (Nakada y Sweeny, 1967). La baja expresión en respuesta a la infección por *X. californiensis* del gen que codifica para Alginasa en SSD sugiere una disminución en el metabolismo digestivo, y en consecuencia, una deficiencia en el estado nutricional de los animales lo que ocasionaría un incremento en la susceptibilidad a enfermedades como el SD. Esto debido probablemente a una disminución en los precursores de la síntesis de proteínas, lípidos y carbohidratos (Ten Doeschate y Coyne, 2008). En nuestro estudio, la baja expresión de la Alginasa en el grupo SSD podría estar relacionada con el nivel de intensidad de la enfermedad ocasionada por la infección con *X. californiensis*, indicando un menor consumo de alimento por los organismos. Los animales que presentaron una infección avanzada mostraron una disminución en la expresión génica para todos los genes evaluados en comparación con los animales que mostraron menores niveles de infección. Esto puede reflejar que a una mayor expresión génica, los organismos son

más resistentes a la infección bacteriana o que la infección no ha alcanzado niveles críticos.

La resistencia es un término relativo y de acuerdo con Coustau y Theron (2004) es definida como la capacidad que un grupo o grupos de individuos poseen al ser más capaces de evitar el desarrollo de un agente infeccioso con respecto al otro grupo, en donde aquellos organismos resistentes a una enfermedad en un determinado ambiente pueden no ser eficientes en otro ambiente donde puede existir una fuerte presión de la enfermedad u otra variante del patógeno. Partiendo de lo anterior, la resistencia puede resultar de una inducción con el fin de mejorar una respuesta de defensa (de comportamiento, química, inmunológica, estructural) (Coustau y Theron, 2004). Por ejemplo, en las ostras, los mecanismos de resistencia pueden basarse en la expresión de las isoformas de diferentes enzimas (por ejemplo fenoloxidasas) (Bezemer *et al.*, 2006) o en una elevada respuesta inmune innata que corresponde a una regulación de recursos meramente energéticos, en donde el estado fisiológico del organismo relacionado con un buen estado nutricional influye directamente sobre la capacidad de respuesta al estrés ocasionado por patógenos, contaminantes o factores ambientales (Huvet *et al.*, 2004).

En general, la caracterización de los genes sobreexpresados y en especial aquellos que sólo se expresaron en determinado grupo puede eventualmente conducir a la identificación de genes de resistencia a *X. californiensis*. Los genes evaluados en este estudio también se pueden asignar a mapas de ligamiento genético y potencialmente servir como genes candidatos que generan resistencia a enfermedades (mapeo de caracteres cuantitativos abreviado "QTL" por su significado en inglés "*Quantitative trait loci*"). El mapeo de QTLs es un paso preliminar para trabajar con mejoramiento asistido por marcadores moleculares.

5.2 Conclusiones

- Fue evidente la existencia de patrones de expresión génica diferencial entre los tratamientos (SSD y ASD). Mostrando que las transcripciones de Ferritina, HSP90, SeGPx, GSTisof1 y Alginasa presentan niveles de expresión más altos contra *X. californiensis* en organismos ASD, en comparación con SSD.
- Dado que las enzimas AbTNF- α y MEP solo se expresaron en el grupo ASD, se podrían sugerir que existe una estrecha relación con el desarrollo del SD en abulón rojo.
- Entre las enzimas antioxidantes, el gen de la GSTisof1 mostró los niveles más altos de expresión, lo que sugiere que tiene un uso potencial como un marcador inmunológico de infección patógena.
- Altos niveles de expresión de la enzima Alginasa se relacionan con la capacidad digestiva de los organismos, lo que podría sugerir una fuerte relación entre energía consumida y la resistencia a patógenos.
- Las diferencias en los patrones de expresión en ambos grupos podría ser un punto de partida para nuevas investigaciones con marcadores genéticos de resistencia a las enfermedades en *H. rufescens*.
- El presente estudio proporciona información sobre la capacidad transcripcional del abulón rojo *Haliotis rufescens* SSD y ASD, para responder a la enfermedad.
- Se confirma que *X. californiensis* puede estar presente en abulón rojo con signos y sin signos externos del SD.
- Los abulones sintomáticos al SD (SSD) presentaron un índice de condición menor que los organismos asintomáticos (ASD) y que los libres de *X. californiensis*.
- La oxitetraciclina fue igualmente efectiva para el tratamiento de *X. californiensis* con baños (de 650 mg L⁻¹) y con inyecciones (10 mg OTC ml⁻¹ en una solución de NaCl al 2%) para abulones de 5.9 \pm 0.6 cm de longitud de concha (29 \pm 4 g de peso total).

5.3 Recomendaciones

- Realizar infecciones experimentales con *X. californiensis*, con el fin de conocer cómo es afectada la expresión de estos genes durante una infección inicial.
- Realizar estudios adicionales sobre curvas de concentración-respuesta específicas en abulón, así como de las concentraciones residuales de OTC en distintos tejidos y su posible efecto en la comercialización.
- Es necesario secuenciar todos los amplicones obtenidos con el fin de corroborar la secuencia y posibles variantes de los genes amplificados en el presente estudio.
- Realizar experimentos a mediano y largo plazo con el fin de descartar la posibilidad de resistencia antibiótica al utilizar baños de agua con OTC.
- Aplicar este tipo de estudios a otras especies de abulón como el azul (*H. fulgens*) y el amarillo (*H. corrugata*).
- Realizar estudios para la identificación de QTLs (por su significado en inglés “*Quantitative trait loci*”).

Referencias bibliográficas

- Adema, C. M., Van der Knaap, W. P. W., & Sminia, T. (1991). Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Reviews in Aquatic Sciences*. 4: 201-223.
- Aktipis, S. W., Giribet G., Lindberg, D. R., & Ponder, W. F. (2008) Gastropod an overview and analysis. In: Ponder, W. F., Lindberg, D.R., (eds). *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. (pp. 201-237). University of California Press: Berkeley.
- Álvarez-Tinajero, M. del C., Cáceres-Martinez, J., & González-Aviles, J. G. (2002) Histopathological evaluation of the yellow abalone (*Haliotis corrugate*) and the blue abalone (*Haliotis fulgens*) from Baja California, Mexico. *Journal of Shellfish Research*. 2: 825–830.
- Andree, K. B., Friedman, C. S., Moore, J. D., & Hedrick, R. P. (2000). A polymerase chain reaction for detection of genomic DNA of a Rickettsiales-like prokaryote associated with Withering Syndrome in Black Abalone (*Haliotis cracherodii*). *Journal of Shellfish Research*. 19: 213–218.
- Babior, B. M., Kipnes, R. S., & Curnutte, J. T. (1973). Biological defense mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *Journal of Clinical Investigation*. 52: 74-114.
- Bieri, O., Kiefhaber, T. (2000). Kinetics models in protein folding. Recuperado de http://hydra.icgeb.trieste.it/~pongor/biophys-homepage/Pain_book/CH02.pdf
- Balseiro, P., Aranguren, R., Gestal, C., Novoa, B., & Figueras, A. (2006). *Candidatus Xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture*. 4: 63-72.
- Bezener, A. M., Dunn, M., Dyer, O., Hawes, R., Hayes, T., Richardson, H., & White, B. (2006). Draft Recovery Strategy for Species at Risk in the South Okanagan and Lower Similkameen Valleys of British Columbia, Canada: Towards Integrating the Landscape-Level and Single-Species Approaches to Conservation. Recuperado de http://www.llbc.leg.bc.ca/Public/PubDocs/bcdocs/400484/bezener_edited_final_feb_8.pdf.
- Blanchette, B. N., Singh, B. R. (1999). Purification and characterization of the glutathione-S-transferases from the northern quahog *Mercinaria mercinaria*. *Marine Biotechnology*. 1:74–80.

- Blanchette, B., Feng, X., & Singh, B. R. (2007). Marine glutathione S-transferases. *Marine Biotechnology*. 9: 513–42.
- Boutet, I., Tanguy, A., Rousseau, S., Auffret, M., & Moraga, D. (2003). Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (HSP70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress and Chaperones*. 8 (1): 76-85.
- Braid, B. A. (2004). Biochemical and histologic changes in red abalone (*Haliotis rufescens*) subjected to eight different treatment combinations of exposure to the agent of withering syndrome, water temperature, and food availability. (M.S. Thesis). University of California, Davis.
- Braid, B. A., Moore, J. D., Robbins, T. T., Hedrick, R. P., Tjeerdema, R. S., & 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: 219–231.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*. 34(3): 597–601.
- Box, A., Martin, D., & Deudero, S. (2010). Changes in seagrass polychaete assemblages after invasion by *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* (Chlorophyta: *Caulerpales*): community structure, trophic guilds and taxonomic distinctness. *Scientia Marina*. 74(2): 317-329.
- Cáceres-Martínez, J. A., Tinoco-Orta, G. D. (2001). Symbionts of cultured red abalone *Haliotis rufescens* from Baja California, Mexico. *Journal of Shellfish Research*. 20 (2): 875-881.
- Cáceres-Martínez, J. A., Vasquez-Yeomans, R. (2009). Estudio histopatológico del abulón rojo *Haliotis rufescens* pertenecientes a la empresa Abulones Cultivados, S.A. DE C.V. en Baja California, México. Instituto de Sanidad Acuícola A.C. (5 p.).
- Cáceres-Martínez, J. A., Vásquez-Yeomans, R. (2010). Analysis of a mortality episode of cultured blue abalone *Haliotis fulgens* associated with the presence of *Xenohaliotis californiensis* and other symbionts. Recuperado de <https://www.was.org/magazine/>
- Cáceres-Martínez, J. A., Vasquez-Yeomans, R., & Flores-Saaib, R. D. (2011). Intracellular prokaryote *Xenohaliotis californiensis* in abalone *Haliotis spp.* from Baja California, México. *Ciencia Pesquera*. 19(2): 5-11.

- Canesi, L., Barmo, C., Fabbri, R., Ciacci, C., Vergani, L., & Roch, P. (2010). Effects of vibrio challenge on digestive gland biomarkers and antioxidant gene expression in *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 152: 399-406.
- Casadevall, A., Nosanchuk, J. D., Williamson, P., & Rodrigues, M. L. (2009). Vesicular transport across the fungal cell wall. *Trends in Microbiology*. 17: 158–162.
- Cellura, C., Toubiana, M., Parrinello, N., & Roch, P. (2006). HSP70 gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*. *Development and Comparative Immunology*. 30: 984-997.
- Cellura, C., Toubiana, M., Parrinello, N., & Roch, P. (2007). Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. *Fish and Shellfish Immunology*. 22: 340-350.
- Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J. R., & Yewdell, J. W. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Natural Medicine*. 7(12): 1306-12.
- Cheng, W, Juang, F. M., & Chen, J. C. (2004). The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. *Fish and Shellfish Immunology*. 16: 295-306.
- Cheng, P. Z., Liu, X., Zhang, G. F., & He, J. G., (2007). Cloning and expression analysis of a HSP70 gene from Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Fish and Shellfish Immunology*. 22: 77–87.
- Cheng, T. C. (1984). A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences. In: Cheng, T. C. (ed.), *Comparative Pathobiology, Invertebrate blood cells and serum factors*. (pp. 111-146). Plenum press: New York.
- Coghill, D. R., Rhodes, S. M., & Thrower, M. (2001). A neuropsychological investigation of psychostimulant drug-treatment naive boys with hyperkinetic disorder (ADHD). *Journal of Psychopharmacology*. 9: 15-55.
- Coustau, C., Theron, A., (2004). Resistant or resisting: seeking consensus terminology. *Trends in Parasitology*. 20: 209–210.
- Cho, S. G., Lee, Y. H., Park, H. S., Ryoo, K., Kang, K. W., & Park, J. (2001). Glutathione S-transferase modulates the stress-activated signals by suppressing

apoptosis signal-regulating kinase 1. *Journal of Biological Chemistry*. 276:12749–55.

Craig, E. A. (1985). The heat shock response. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 18: 239-280.

Cruz-Flores, R., Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., & Guerrero-Rentería, Y. (2013). Distribution prevalence and intensity of *Xenohaliotis californiensis* parasite of abalone, *Haliotis fulgens* and *Haliotis corrugata* in the peninsula of Baja California, México. 46th Annual Meeting Western Society of Malacologist. Recuperado de <http://biology.fullerton.edu/wsm/conferences.html>

Cook, P.A., Gordon, H.R. (2010). World abalone supply, markets, and pricing. *Journal of Shellfish Research* 29(3): 569-571.

Cox, K.W. (1962). California abalones, family Haliotidae. California Department of Fish and Game, Fish Bulletin. 1: 118-133.

Darias, M. J., Zamborino-Infante, J. L., & Hugo, K., (2008). Gene expression patterns during the larval development of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by microarrays analysis. *Marine Biotechnology*. 10: 416-428.

De Zoysa, M., Lee, J. (2007). Molecular cloning and expression analysis of interferon-g inducible lysosomal thiol reductase (GILT)-like cDNA from disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 96: 221-229.

De Zoysa, M., Whang, I., & Lee J. (2009). Transcriptional analysis of antioxidant and immune defense genes in disk abalone (*Haliotis discus discus*) during thermal, low-salinity and hypoxic stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 154: 387-395.

De Zoysa, M., Whang, I., Nikapitiya, C., Choi, C.Y., & Lee J. (2011). Transcriptional analysis of disk abalone (*Haliotis discus discus*) antioxidant enzymes against marine bacteria and virus challenge. *Fish and Shellfish Immunology*. 31: 155-160

Dale, J. W., Von-Schantz, M. (2007). From genes to genomes: Concepts and applications of DNA technology. 2th Ed. Wiley. New York.

Dhiman, N., Bonilla, R., O’Kane, J. D., & Poland, G. A. (2001). Gene expression microarrays a 21st century tool for directed vaccine design. *Vaccine*. 20: 22-30.

- Diario Oficial de la Federación (2012). Carta Nacional Acuícola. México. Texto vigente. Recuperado de <http://www.inapesca.gob.mx/portal/publicaciones/carta-nacional-acuicola>
- Diario Oficial de la Federación (2012). Carta Nacional Pesquera. México. Texto vigente. Recuperado de <http://www.inapesca.gob.mx/portal/publicaciones/carta-nacional-pesquera>
- Di-Giulio, R. T., Washburn, P. C., Wenning, R. J., Winston, G. W., & Jewell, C. S. (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 8: 1103–1123. doi: 10.1002/etc.5620081203
- Ding, Y. C., Hawkes, N., Meredith, J., Eggleston, P., Hemingway, J., & Ranson H. (2005). Characterization of the promoters of Epsilon glutathione transferases in the mosquito *Anopheles gambiae* and their response to oxidative stress. *Journal of Biochemistry*. 387: 879–88.
- Dohertz, C.P. (2007). Host–pathogen interactions: the role of iron. *Journal of Nutrition*. 137: 1341–1344.
- Dong, Y., Taylor, H. E., & Dimopoulos, G. (2006). AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS Biology*. 4: 220-229.
- Donaghy, H., L. Bosnjak, A. N. Harman, V. Marsden, S. K. Tying, T. C., & Cunningham, A. L. (2009). Role for plasmacytoid dendritic cells in the immune control of recurrent human herpes simplex virus infection. *Journal of Virology*. 83: 1952–1961.
- Dubovskiy, I. M., Martemyanov, V. V., Vorontsova, Y. L., Rantala, M. J., Gryzanova, E. V., & Glupov, V. V. (2008). Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 148: 1–5.
- Edwards, Anthony W. F. (2004). *Cogwheels of the Mind: The Story of Venn Diagrams*. Recuperado de http://books.google.com.mx/books/about/Cogwheels_of_the_Mind
- Ekanayake, P.M., De Zoysa, M., Kang, H.S., Wan, Q., Jee, Y., & Lee, Y.H. (2008). Cloning, characterization and tissue expression of disk abalone (*Haliotis discus discus*) catalase. *Fish and Shellfish Immunology*. 24: 267-278.

- Farcy, E., Serpentine, A., Fiévet, B., & Lebel, J. M. (2007). Identification of cDNAs encoding HSP70 in the abalone *Haliotis tuberculata*: transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 146: 540-550.
- Farrell, R., (2010). RNA methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/book>
- Fitzpatrick, P. J., Krag, T. O., Hojrup, P., & Sheehan, D. (1995). Characterization of a glutathione S-transferase and a related glutathione-binding protein from gill of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Journal of Biochemistry*. 305: 145–50.
- Fletcher, T., White, A., & Baldo, B. (1977). Reactive protein-like precipitin and lysozyme in the lump sucker *Cyclopterus lumpus* L during the breeding season. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 57: 353-357.
- Flores-Aguilar, R. A., Gutiérrez, A., Ellwanger, A., & Searcy-Bernal, R. (2007). Development and current status of abalone aquaculture in Chile. *Journal of Shellfish Research*. 26: 705-711.
- Friedman, C. S., Andree, K. B., Beauchamp, K. A., Moore, J. D., Robbins, T. T., Shields, J. D., & Hedrick, R. P. (2000). “*Candidatus Xenohaliotis californiensis*” a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 847– 855.
- Friedman, C. S., Biggs, W., Shields, J. D., & Hedrick, R. P. (2002). Transmission of Withering Syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach. *Journal of Shellfish Research*. 21 (2): 817-824.
- Friedman, C. S., Finley, C. A. (2003). Evidence for an anthropogenic introduction of “*Candidatus Xenohaliotis californiensis*”, the etiological agent of withering syndrome, into northern California abalone populations via conservation efforts. *Journal Fisheries and Aquatic Sciences*. 60: 1424-1431.
- Friedman, C. S., Thomson, M., Chun, C., Haaker, P. L., & Hedrick, R. P. (1997). Withering syndrome of the black abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): Water temperature, food availability, and parasites as possible causes. *Journal of Shellfish Research*. 16: 403–411.
- Friedman, C. S., Trevelyan, G., Mulder, E. P., & 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 (4): 1–23.

- Friedman, C. S., (2012). Infection with *Xenohaliotis californiensis*. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Recuperado de www.oie.int/esp/normes/fmanual/2.4.07
- Gao, Q., Song, L., Ni, D., Wu, L., Zhang, H., & Chang, Y. (2007). CDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 147: 704-715.
- Gardner, G. R., Harshberger, J. C., Lake, J., Sawyer, T. K., Price, K. L., Stephenson, M. D., Haaker, P. L., & Togstad, H. A. (1995). Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 66: 111–120.
- Geiger, D. L., Poppe, G. T., (2000). The family Haliotidae. In: G.T. Poppe & K. Groh (Eds.), *Conchological Iconography*. (pp. 83-135). Conch books, Hackenheim.
- Gestal, C., Costa, M. M., Figueras, A., & Novoa, B. (2007). Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: Identification of new antimicrobial peptides. *Gene*. 406: 134-143.
- González, R. C., Brokordt, K., & Lohrmann, K. B. (2012). Physiological performance of juvenile *Haliotis rufescens* and *Haliotis discus hannai* abalone exposed to the withering syndrome agent. *Journal of Invertebrate Pathology*. 111 (1): 20-6. doi: 10.1016/j.jip.2012.05.00
- Gordon, D., Adelman, L., Ashworth, K., Bradshaw, J., Levitas, R., Middleton, S., Pantazis, C., Patsios, D., Payne, S., Townsend, P., & Williams, J. (2000). Poverty and social exclusion in Britain. Recuperado de <http://www.york.ac.uk/inst/spru/pubs/pdf/povSE.pdf>
- Giglio, S., Monis, P. T., & Saint, C. P. (2003). Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research*. 31: 130-136.
- Guzmán-del Prío, S.A. (1992). A review of the biology of abalone and its fishery in Mexico. In: S.A. Shepherd, M.J. Tegner, S.A. Guzmán-del Prío (eds.), *Abalone of the World: Their Biology, Fisheries and Culture*. (pp. 341–360) Blackwell Scientific. Oxford, UK.
- Haaker, P. L., Parker, D. O., Togstad, H., Richards, D. V., Davis, G. E., & Friedman, C. S. (1992). Mass mortality and withering syndrome in black abalone *Haliotis*

cracherodii, in California. In: Shepard S.A., Tegner M.J., & Guzman del Proo S.A., (eds). Abalone of the World: Biology, fisheries and culture. (pp. 214–224) Blackwell Scientific. Oxford, UK.

Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 381: 571–580.

Hahn, K. O. (1992). Review of endocrine regulation of reproduction in abalone *Haliotis spp.* In: Shepherd, S. A.; Tegner, M. J.; Guzman del Prío, S. A. (eds). Abalone of the world: Biology, fisheries and culture. (pp. 49-58) Blackwell Scientific. Oxford, UK.

Hedrick, S. (2004). The acquired immune system a vantage from beneath. *Immunity*. 21: 607-615.

Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., Majeske, A. J., Cohen, A. H., & Terwilliger, D. P. (2006). The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Developmental Biology*. 300: 349-365.

Hightower, L. E., & Hendershot, L. M. (1997). Molecular chaperones and the heat shock response at Cold Spring Harbor. *Cell Stress and Chaperones*. 2: 1–11.

Hillier, B. J., Vacquier, V. D. (2003). Amassin, an olfactomedin protein, mediates the massive intercellular adhesion of sea urchin coelomocytes. *Journal of Cell Biology*. 160(4): 597-604.

Hoarau, C., Bore, J., Laumonier, J., & Gervais, Y. (2006). Analysis of the wall pressure trace downstream of a separated region using extended proper orthogonal decomposition. *Physics of Fluids*. 18: 055-107.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*. 6: 986-994.

Hong-Lin, R., Dan-Dan, X., Gopalakrishnan, S., Kun, Q., Wei-Bin, H., & Ke-Jian, W. (2009). Gene cloning of a sigma class glutathione S-transferase from abalone (*Haliotis diversicolor*) and expression analysis upon bacterial challenge. *Developmental and Comparative Immunology*. 33: 980–990.

Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Handlinger, J., & Benkendorff, K. (2007). Stress and immune responses in abalone: limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish and Shellfish Immunology*. 22: 363-379.

- Howard, D. W., Lewis, E.J., Keller, J., & Smith, C. S. (2004). Histological Techniques for marine bivalve mollusk and crustaceans. In: Kinne, O. (Ed.). NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5. (pp. 1985-1990) Biologische Antalt. Helgoland.
- Huvet, A., Herpin, A., Dégremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.F., & Cunningham, C. (2004). The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene*. 343: 211–220.
- Jacob, D. J., Logan J. A., Gardner G. M., Yevich, R.M., Spivakovsky, C.M., Wofsy, S.C., Sillman, S., & Prather, M.J. (1993). Factors regulating ozone over the United States and its export to the global atmosphere. *Journal of Geophysical Research*. 98: 817-826.
- Janeway, C. (2001). How the immune system works to protect the host to the infection: A personal view. *Proceedings National Academy of Sciences*. 98: 7461-7468.
- Jenny, M. J., Chapman, R. W., Mancina, A., Chen, Y. A., McKillen, D. J., & Trent, H. (2007). A cDNA microarray for *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*. 9: 577-591.
- Jowsey, I. R., Thomson, A. M., Flanagan, J. U., Murdock, P. R., Moore, G. B. T., & Meyer, D. J. (2001). Mammalian class Sigma glutathione S-transferases: catalytic properties and tissue-specific expression of human and rat GSH-dependent prostaglandin D-2 synthases. *Journal of Biochemistry*. 359: 507–516.
- Kang, Y. S., Kim, Y. M., Park, K. I., Cho, S. K., Choi, K. S., & Cho, M. (2006). Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Developmental and Comparative Immunology*. 30: 1119-1131.
- Karp, R. D., Coffaro, K. A. (1980). Cellular defense systems of the Echinodermata. In: Manning E.D., (ed.). *Phylogeny of Immunological Memory*. (pp. 257-282). Elsevier: Amsterdam.
- Kashiwada, M., Cassel, S. L., Colgan, J. D., & Rothman, P. B. (2011). NFIL3/E4BP4 controls type 2 T helper cell cytokine expression. *EMBO Journal*. 30: 2071–2082.
- Kimura, Y., Tanaka, K. (2010). Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *Journal of Biochemistry*. 147 (6): 793–798.

- Kismohandaka, G., Roberts, W., Hedrick, R. P., & Friedmn, C. S. (1995). Physiological alterations of the black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach, with withering syndrome. *Journal of Shellfish Research*. 14 (1): 269–270.
- Klein, J. (1989). Are invertebrates capable of anticipatory immune responses. *Scandinavian Journal of Immunology*. 29: 499-505.
- Kleinveld, H. A., Swaak A. J. G., Hack C. E., & Koster J. F. (1989). Interactions between oxygen free radicals and proteins. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. 18: 341-352.
- Kobayashi, Y., Kawaguchi, Y., Mizuta, T., & Kuwashiro, T. (2011). Metabolic factors are associated with serum alanine aminotransferase levels in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Gastroenterology*. 46: 529-535.
- Kourtidis, A., Scouras, Z.G. (2005). Analysis and characterization of the transcriptional unit of a new *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia) HSP70 gene. *Gene*. 16: 36- 43.
- Leighton, D.L. (2000). *The biology and culture of the California abalones*. Dorrance Publishing: Pittsburg.
- Lee, Y. M., Lee, K. W., Park, H., Park, H. G., Raisuddin, S., & Ahn, I. Y. (2007). Sequence, biochemical characteristics and expression of a novel Sigma-class of glutathione S-transferase from the intertidal copepod, *Tigriopus japonicus* with a possible role in antioxidant defense. *Chemosphere*. 69: 893–902.
- Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology*. 68: 253-278.
- Limon-Pacheco, J., Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidantrelated enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*. 674: 137-147.
- Lindquist, S., Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*. 22: 631–677.
- Little, M., Seehaus, T. (1988). Comparative analysis of tubulin sequence. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 90 (4): 655–670

- Li, C. H., Ni, D. J., Song, L. S., Zhao, J., Zhang, H., & Li, L. (2008). Molecular cloning and characterization of a catalase gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish and Shellfish Immunology*. 24: 26-34.
- Loker, E. S., Adema, C. M., Zhang, S. M., & Kepler, T. B. (2004). Invertebrate immune systems-not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological Reviews*. 198: 10-24.
- Llimargas, M., Strigini, M., Katidou, M., Karagogeos, D., & Casanova, J. (2004). Lachesin is a component of a septate junction-based mechanism that controls tube size and epithelial integrity in the *Drosophila tracheal* system. *World Development*. 131: 181-190.
- Martello, L. B., Tjeerdema, R. S. (2001). Combined effects of pentachlorophenol and salinity stress on chemiluminescence activity in two species of abalone. *Aquatic Toxicology*. 51: 351-362.
- Matz, M. V. (2002). Amplification of representative cDNA samples from microscopic amounts of invertebrate tissue to search for new genes. *Methods in Molecular Biology*. 183: 3-18.
- Mah, S. A., Moy, G. W., Swanson, W. J., & Vacquier, V. D. (2004). A perforin-like protein from a marine mollusk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 316: 468-475.
- Matsuyama, T., Fujiwara, A., Nakayasu, C., Kamaishi, T., Oseko, N., & Tsutsumi, N. (2007). Microarray analysis of gene expression in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* leucocytes during monogenean parasite *Neoheterobothrium hirame* infection. *Diseases of Aquatic Organisms*. 75:79-83.
- Mebrahtu, T. A., Markham, F., Mateo, D. R., McKenna, P., Johnson, G. R., Berthe, F., & Siah, A. (2010). Identification and expression of immune-related genes in hemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*, challenged with *Vibrio splendidus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 29 (4): 557–564.
- McPherson, M. J., Hames, B. D., & Taylor, G. R. (2008). *PCR a Practical Approach*. Oxford University Press. Oxford, UK.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M., & Roch, P.H. (2000). Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defence. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 12954-12962

- Moore, J. D., Cherr, G. N., & Friedman, C. S. (2001). Detection of "*Candidatus Xenohaliotis californiensis*" (Rickettsiales-like prokaryote) inclusions in tissue squashes of abalone (*Haliotis* spp.) gastrointestinal epithelium using a nucleic acid fluorochrome. *Diseases in Aquatic Organisms*. 46: 147–152.
- Moore, J. D., Robbins, T. T., & Friedman, C. S. (2000). Withering syndrome in farmed red abalone *Haliotis rufescens*: Thermal induction and association with agastrointestinal *rickettsia*-like prokaryote. *Journal of Aquatic Animal Health*. 12: 26–34.
- Moore, J. D., Robbins, T. T., Hedrick, R. P., & Friedman, C. S. (2001). Transmission of the Rickettsiales-like prokaryote "*Candidatus Xenohaliotis californiensis*" and its role in withering syndrome of California abalone *Haliotis* spp. *Journal of Shellfish Research*. 20 (2): 867–874.
- Moore, J. D., Juhasz, C., Robbins, T., & Vilchis, 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: 2325–2330.
- Paillard, C., Roux, F. L., & Borrego, J. J. (2004). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquatic Living Resources*. 17:477-498.
- Perrigault, M., Tanguy, A., & Allam, B., (2009). Identification and expression of differentially expressed genes in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, in response to quahog parasite unknown (QPX). *BMC Genomics*. 10: 377.
- Piano, A., Franzellitti, S., Tinti, F., & Fabbri, E. (2005). Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Gene*. 361: 119-26.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., Bell, S. M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A. J., Robinson, P. A., Inglehearn, C. F., Isaacs, J. D., & Markham, A. F. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*. 3 (18): 1472-6750.
- Pujol-Moix, (2001). Trombocitopenias. Recuperado de <http://books.google.com.mx/book/about/Trombocitopenia>

- Ralmondi, P. T., Wilson, C. M., Ambrose, R. F., Engle J. M., & Minchinton, T. E. (2002). Continued declines of black abalone along the coast of California: Are mass mortalities related to El Niño events. *Marine Ecology Progress Series*. 242: 143–152.
- Rathinam, A. V., Chen, T. T., & Grossfeld, R. M. (2000). Cloning and sequence analysis of a cDNA for an inducible 70 kDa heat shock protein (HSP70) of the American Oyster (*Crassostrea virginica*). *DNA Sequence*. 11: 261–264.
- Recalcati, S., Invernizzi, P., Arosio, P., & Cairo, G., (2008). New functions for an iron storage protein: the role of ferritin in immunity and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*. 30: 84–89.
- Roch, P. (1999). Defense mechanisms and disease prevention in farmed invertebrates. *Aquaculture*. 172: 125-145.
- Rowley, A. F., & Powell, A. (2007). Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific. *Journal of Immunology*. 179. 7209–7214.
- Sahaphong, S., Linthong, V., Wanichanon, C., Riengrojpitak, S., Kangwanrangsan N., & Viyanant, V. (2001). Morphofunctional study of the haemocytes of *Haliotis asinina*. *Journal of Shellfish Research*. 20: 711-716.
- Salinas-Clarot, A., Gutiérrez, A. P., Núñez-Acuña, G., & Gallardo-Escárate, C. (2010). Molecular characterization and gene expression of ferritin in red abalone (*Haliotis rufescens*). *Fish and Shellfish Immunology*. 2: 1-4. doi:10.1016/j.fsi.2010.09.009
- Salinas, A. E., Wong, M.G. (1999). Glutathione S-transferases—a review. *Journal of Medicinal Chemistry*. 6 (4): 279–309.
- Sambrook, J.F., Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Recuperado de <http://www.gobookee.org/sambrook-molecular-cloning-a-laboratory-manual/>
- Silva-Aciaras, F., Moraga, D., Auffret, M., Tanguy, A., & Riquelme, C. (2013). Transcriptomic and cellular response to bacterial challenge (pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*) in farmed juvenile *Haliotis rufescens* fed with or without probiotic diet. *Journal of Invertebrate Pathology*. 113: 163-176.
- Sierra, R. P. (2004). Incertidumbre y riesgo en puntos de referencia para el manejo de la pesquería de abulón en la Península de Baja California, México. (Tesis de maestría). IPN-CICIMAR. La Paz, Baja California Sur, México.

- Schlesinger, M.J. (1990). Heat shock proteins. *Journal of Biology Chemistry*. 265 (21): 12-111.
- Shaw, B. L., Battle, H.I. (1957). The gross and microscopic anatomy of the digestive tract of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoology*. 35: 325-347.
- Searcy-Bernal, R., Ramade-Villanueva, M. R., & Altamira, B. (2010). Current status of abalone fisheries and culture in México. *Journal of Shellfish Research*. 29(3): 573-576.
- Singh, U., Singh, S., Weaver, C., Iqbal, N., McGhee, J., James, W., & Lillard, J. R. (2003). IFN- γ -inducible chemokines enhance adaptive immunity and colitis. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 23(10): 591–600.
- Steinbeck, J. R., Groff, J. M., Friedman, C. S., Mcowell, T. & Hedrck, R. P. (1992). Investigations into mortality among populations of the California black abalone, *Haliotis cracherodii*, on the central coast of California, USA. In: Shepard S.A., Tegner M.J. & Guzman del Proo S.A., (eds). *Abalone of the World, fisheries and culture*. (pp. 203–213). Blackwell Scientific. Oxford, UK.
- Storey, K. B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*. 29:1715-1733.
- Song, L., Xu, W., Li, C., Li, H., Wu, L., Xiang, J., & Guo, X. (2006). Development of expressed sequence tags from the bay scallop *Argopecten irradians irradians*. *Marine Biotechnology*. 8: 161-169.
- Tanguy, A., Guo, X., & Ford, S. E. (2004). Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene*. 338: 121-131.
- Ten Doeschate, K. I., Coyne, V. E. (2008) Improved growth rate in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture*. 284: 174–179
- Tomarev, S. I., Zinovieva, R. D., & Piatigorsky, J. (1993). Primary structure and lens-specific expression of genes for an intermediate filament protein and a β -tubulin in cephalopods. *Journal of Biology Chemistry*. 268: 4534-4542
- Travers, M., Meistertzheim, A., Cardinaud, M., Friedman, C., Huchette, S., Moraga, D., & Paillard, C. (2010). Gene expression patterns of abalone, *Haliotis tuberculata*,

during successive infections by the pathogen *Vibrio harveyi*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 105: 289–297.

- Troell, M., Robertson-Andersson, D., Anderson, R.J., Bolton, J.J., Maneveldt, G., Halling, C. & Probyn, T. (2006). Abalone farming in South Africa: an overview with perspectives on kelp resources, abalone feed, potential for on-farm seaweed production and socio-economic importance. *Aquaculture*. 257: 266–281.
- Valasek, M.A., Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*. 29: 151-159.
- Valles, H. R. (1998). Análisis histopatológico del abulón negro *Haliotis cracherodii* afectado por el síndrome de deterioro. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, México.
- Van Blaricom, G. R., Ruediger, J. L., Friedman, C. S., Woodard, D. D., & Hedrick R. P. (1993). Discovery withering syndrome among black abalone populations at San Nicolas Island, California. *Journal of Shellfish Research*. 12 (2): 185–188.
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environment Toxicology and Pharmacology*. 13: 57-149.
- Veldhuizen-Tsoerkan, M. B., Holwerda, D. A., Bont A. M. T., Smaal, A. C., & Zandee, D.I. (1991). A field study on stress indices in the sea mussel, *Mytilus edulis*: application on the "stress approach" in biomonitoring. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 21: 497-504
- Villena, A. J. (2003). Applications and needs of fish and shellfish cell culture for disease control in aquaculture. *Review in Fish Biology and Fisheries*. 13:111-140.
- Walker, N. J. (2002). Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science*. 296: 557-559.
- Wan, Q., Whang, I., & Lee, J. (2008). Molecular characterization of muscles glutathione-S-transferase from disk abalone (*Haliotis discus discus*), a potential biomarker of endocrine-disrupting chemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 150: 187–199.
- Wang, K. J., Ren, H. L., Xu, D. D., Cai, L., & Yang, M. (2008a). Identification of the up-regulated expression genes in hemocytes of variously colored abalone (*Haliotis*

diversicolor Reeve, 1846) challenged with bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*. 32: 1326-1347.

- Wang, G., Zhang, K., Zhang, Z., Zou, Z., Jia, X., Wang, S., Lin, P., & Wang, Y. (2008b). Molecular cloning and responsive expression of macrophage expressed gene from small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Fish and Shellfish Immunology*. 24: 346–359.
- Watson, F.L., Puttmann-Holgado, R., Thomas, F., Lamar, D.L., Hughes, M., Kondo, M., Rebel, V.I., & Schmucker, D. (2005). Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science*. 309: 1874–1878.
- Welch, L. S., Luostarinen, R. K. (1993). “Inward-Outward Connections in Internationalization.” *Journal of International Marketing*. 1: 44-55.
- Wetchateng, T. (2008). *Rickettsia*-like organism (RLO) infection in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*: Histopathology, diagnosis and treatment. (PhD.). Mahidol University, Bangkok, Thailand.
- Wetchateng, T., Friedman, C.S., Wight, N.A., Lee P. Y., Teng P.H., Sriurairattana, S., Wongprasert, K., & Withyachumnarnkul, B. (2010). Withering syndrome in abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Aquatic Animal Diseases*. 90 (1): 69–76.
- Wyckoff, E., Mey, A., & Payne, S. (2007). Iron acquisition in *Vibrio cholerae*. *Biometals* 20: 405–416.
- Yang, H. L., Zeng, Q. Y., Li, E. Q., Zhu, S. G., & Zhou, X. W. (2004). Molecular cloning, expression and characterization of glutathione S-transferase from *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 139: 175–82.
- Zhang, W. B., Wu, C. L., Mai, K. S., Chen, Q. Y., & Xu, W. (2011). Molecular cloning, characterization and expression analysis of heat shock protein 90 from Pacific abalone, *Haliotis discus hannai* Ino in response to dietary selenium. *Fish and Shellfish Immunology*. 30: 280–286.

Anexos

Anexo 1. Reacción de Fenton´s

H.J.H Fenton descubrió en 1894 que varios metales tienen características especiales en la transferencia del oxígeno que mejoran el uso del peróxido de hidrógeno. Algunos metales tienen una energía catalítica fuerte para generar los radicales altamente reactivos del hidróxilo (OH[·]). A partir de este descubrimiento, el peróxido de hidrógeno catalizado con hierro se llama la reacción de Fenton. Hoy en día, la reacción de Fenton se utiliza para tratar una gran variedad de contaminantes tales como fenoles, formaldehído, BTEX, pesticidas, productos químicos de la goma en el agua etcétera.

Usos de la reacción de Fenton:

Este proceso puede ser usado en las aguas residuales, en los suelos contaminados y en los lodos con las acciones siguientes:

- Destrucción orgánica del agente contaminador
- Reducción de la toxicidad
- Mejora la biodegradabilidad
- Retiro de DBO y DQO
- Retiro del olor y del color

¿Cómo trabaja la reacción de Fenton?

Después de la adición del hierro y del peróxido de hidrógeno, van a reaccionar juntos para generar algunos radicales del oxhidrilo como se demuestra en las ecuaciones siguientes:



Anexo 2. Tratamientos con OTC

TRATAMIENTO CON BAÑOS E INYECCIONES DE OXITETRACICLINA EN ABULÓN ROJO *Haliotis rufescens* AFECTADOS POR EL SÍNDROME DE DESHIDRATACIÓN

como contribución al proyecto de tesis con nombre:

EXPRESIÓN DE GENES INMUNORRELACIONADOS Y DE ESTRÉS TÉRMICO EN ABULÓN ROJO, *Haliotis rufescens*, SINTOMÁTICO AL SÍNDROME DE DESHIDRATACIÓN

Luis M. Molina-Carrillo, Jorge A. Cáceres-Martínez, Mónica Hernández-Rodríguez y Miguel A. del Río-Portilla

Ensenada, Baja California, México, octubre de 2013.

Resumen

El síndrome de deshidratación (SD) del abulón es una enfermedad crónica causada por un organismo procariota del tipo Rickettsiales clasificado como *Xenohaliotis californiensis*, que afecta a diversas especies del género *Haliotis*, entre ellas al abulón rojo *Haliotis rufescens* cultivado en Baja California. Aunque esta enfermedad ha sido tratada en EE. UU. con relativo éxito mediante inyecciones, tratamientos orales y baños de oxitetraciclina (OTC), existe muy poca información que contraste los resultados de este tipo de tratamientos de la enfermedad. En este sentido, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficiencia en el tratamiento de la infección causada por *X. californiensis* utilizando baños e inyecciones como vías de administración de OTC en el abulón rojo. Para el estudio se usaron abulones con SD y con una intensidad de infección de moderada a severa, previamente estimada mediante análisis histológico en una submuestra. La longitud de la concha de los abulones estudiados fue de 5.9 ± 0.6 cm y peso vivo de 29 ± 4 g. Los tratamientos consistieron en baños de $650 \text{ mg OTC L}^{-1}$ durante una hora diaria por siete días e inyecciones de $10 \text{ mg OTC ml}^{-1}$ en una solución de NaCl al 2% cada 48 h para un total de nueve inyecciones. Como medida de efectividad de los tratamientos se consideró el tiempo de reincorporación (tiempo para que un organismo volteado recupere su posición correcta). Esta medida fue evaluada a los 0, 7, 15, 25 y 30 días, para cada tratamiento. Los baños y las inyecciones de OTC tuvieron un efecto terapéutico significativo ($P < 0.05$) y consistente al día siete, cuando el 90 y 88 % de los organismos se incorporaron a su posición normal en menos de un minuto y manteniéndose así hasta el final del experimento. A los 30 días de tratamientos (baños e inyecciones), todos los organismos mostraron una capacidad fuerte de adhesión al sustrato. El análisis histológico postratamiento realizado a todos los organismos (baños e inyecciones), demostró la ausencia de inclusiones de PTR. El presente estudio enriquece la información sobre el empleo práctico de este tipo de tratamientos y abre la puerta para realizar investigaciones posteriores sobre el uso y manejo de baños e inyecciones de OTC en el cultivo de abulón rojo.

Introducción

El síndrome de deshidratación (SD) es una enfermedad crónica causada por *Xenohaliotis californiensis*, una Procariota del Tipo Rickettsiales (PTR), que afecta a diversas especies de abulón (Friedman *et al.*, 2002; Haaker *et al.*, 1992). La susceptibilidad varía de acuerdo con la especie, en abulones rojos de cultivo la enfermedad es observada generalmente en animales menores a un año de edad (Friedman *et al.*, 2002), mientras que en organismos silvestres se ha observado para todas las clases de tamaño (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Álvarez-Tinajero *et al.*, 2002; Friedman *et al.*, 1997; Haaker *et al.*, 1992; Steinbeck *et al.*, 1992; Van Blaricom *et al.*, 1993). La manifestación clínica de la enfermedad está determinada por la aparición de signos externos tales como: reducción del manto y del músculo del pie,

glándula digestiva pálida, flacidez del músculo, debilidad y letargo (Balseiro *et al.*, 2006; Friedman *et al.*, 2000; Gardner *et al.*, 1995). A nivel histológico la enfermedad es caracteriza por la presencia de inclusiones bacterianas intracelulares generalmente en el esófago posterior, glándula digestiva y en el intestino (Friedman *et al.*, 2000). Los niveles de infección interpretados como moderados a graves están asociados en su mayoría con el número de inclusiones y cambios degenerativos de la glándula digestiva seguidos por la atrofia del músculo del pie (Friedman *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2000; Álvarez-Tinajero *et al.*, 2002). Estos cambios incluyen el reemplazamiento de las miofibras musculares por tejido conectivo, presumiblemente asociado con la inanición inducida por el catabolismo (Gardner *et al.*, 1995; Kismohandaka *et al.*, 1995). Se ha hipotetizado que el consumo de reservas de glucógeno del pie como fuente de energía, deterioran la condición fisiológica del organismo (Friedman *et al.*, 2002; Gardner *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 2001). En este sentido abulones con el SD consumen menos alimento en comparación con abulones sanos (Moore *et al.*, 2000, 2001). De acuerdo con datos obtenidos por González *et al.* (2012), en el abulón rojo *H. rufescens* de cultivo, las infecciones por *X. californiensis* pueden ejercer un efecto negativo sobre el rendimiento fisiológico (tasa de ingestión, metabolismo basal, relación oxígeno/nitrógeno y producción de heces), aun cuando la enfermedad no es evidente. Las importantes pérdidas acumuladas de abulón en instalaciones acuícolas por el SD, desde su aparición y el interés creciente por la cría en cautiverio de varias especies silvestres de gran importancia pesquera en México, han sido los detonantes para la búsqueda de tratamientos inmediatos y/o preventivos con el fin de brindar una solución al problema.

Diversos estudios muestran que el uso de oxitetraciclina (OTC) ha sido eficiente en el tratamiento contra la infección ocasionada por *X. californiensis*, seguido de algunas prácticas de manejo tales como reducción en la densidad de cultivo y el aislamiento de los organismos visiblemente enfermos (Moore *et al.*, 2001; Friedman *et al.*, 2003, 2007; García-Esquivel *et al.*, 2011). La oxitetraciclina (OTC) es conocida como un antibiótico de amplio espectro con actividad bacteriostática en una amplia gama de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, destacando algunas procariotas atípicas tales como rickettsias, clamidias y micoplasmas, y algunos parásitos protistas (Chorpa y Roberts,

2001). Además, de ser uno de los pocos medicamentos antimicrobianos aprobados bajo reserva para su uso terapéutico en algunas especies acuícolas en los EE. UU. y otros países (Schnick, 1998; Chorpa y Roberts, 2001). García Esquivel *et al.* (2011) utilizaron baños con OTC para tratar abulones azules (*Haliotis fulgens*) de ~4.36 cm de longitud de concha (12.2 g de peso vivo). Estos autores utilizaron una concentración de OTC de 400 mgL⁻¹ y estimaron la efectividad del tratamiento a partir de la capacidad de reincorporación y tasa metabólica. Por otro lado, Moore *et al.* (2001) realizaron experimentos inyectando OTC (10 mgml⁻¹ en una solución salina al 2%) en el músculo del pie de abulones afectados por el SD. Por El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficiencia en el tratamiento de la infección por *X. californiensis* utilizando baños e inyecciones como vías de administración de oxitetraciclina en el abulón rojo *Haliotis rufescens* con respecto a los tratamientos empleados en otros estudios.

Materiales y Métodos

Se obtuvieron 150 abulones (longitud de la concha 5.9±0.6 cm y peso vivo de 29±4 g) de la granja comercial “Abulones Cultivados S. A. de C. V.” en agosto de 2012. Los abulones se mantuvieron en el laboratorio de Bioensayos del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) durante tres semanas. Durante este período, los organismos fueron mantenidos en un sistema de recirculación con un bioclarificador de lavado de burbuja (para la remoción de sólidos a 20 µm y filtración biológica), con una lámpara de luz UV de 25 W, con un flujo de 33-38 L min⁻¹, en un volumen total de 200 L a una temperatura de 19±0.8°C. Se alimentaron *ad libitum* con la macroalga marina *Macrocystis pyrifera*. Mediante un análisis histológico de una submuestra de los organismos, se detectó que todos los animales eran portadores de *X. californiensis*, después de esto se seleccionaron 30 abulones para cada tratamiento (baños e inyecciones con OTC). La macroalga, se trató con OTC 650 mg L⁻¹ por una hora, se enjuagó con agua de mar filtrada e irradiada con luz UV, y posteriormente se congeló.

Tratamientos con OTC y evaluación de la recuperación

Para el tratamiento experimental con baños de OTC (Terramicina [clorhidrato de oxitetraciclina], Pfizer Inc.), la solución se preparó diluyendo la OTC con agua de mar

filtrada en un recipiente de plástico de 10 L hasta una concentración final de 650 mg OTC L⁻¹. Para la aplicación de los baños con OTC se siguió el mismo protocolo utilizado por García-Esquivel *et al.* (2011), en el cual el tratamiento fue repitió diariamente por siete días consecutivos, realizándose observaciones visuales y cualitativas de la fuerza de adhesión a los recipientes durante este periodo. Para el caso del tratamiento con inyecciones (10 mg OTC ml⁻¹ en una solución de NaCl al 2%, equivalente a 34.4 mg Kg⁻¹ peso vivo) de OTC en el músculo del pie a la altura de un seno venoso, éstas se realizaron cada 48 h con un total de tres inyecciones. Seguido de dos semanas sin inyecciones y repitiendo la serie dos veces más para un total de 9 inyecciones durante 47 días, de acuerdo con la metodología utilizada por Moore *et al.* (2001). Al finalizar cada tratamiento, los abulones se enjuagaron con agua de mar filtrada antes de ser regresados al sistema de recirculación.

El tiempo de incorporación fue utilizado como un indicador relativo de la capacidad de recuperación de los abulones, la cual es definida por Aquilina y Roberts (2000), como “*el tiempo para que un organismo en posición invertida recupere su posición correcta*”, fue evaluado simultáneamente en ambos tratamientos los días 0, 7, 15, 25 y 30. El procedimiento para medir el tiempo de incorporación fue colocando a los organismos de manera individual en el fondo de un tanque de plástico con la misma agua de mar y volteados, registrando el tiempo de reincorporación. Al final de cada ensayo se determinó y graficó el porcentaje acumulativo de los organismos que recuperaron su posición normal. Además, los organismos de cada tratamiento fueron sacrificados para su posterior análisis histopatológico al cumplir 47 días.

Diagnóstico confirmativo de SD-PTR

Después del tratamiento, se sacrificaron los 30 abulones para determinar la presencia o ausencia de *X. californiensis* que se llevó a cabo mediante el análisis histológico y PCR en tiempo final de acuerdo a los protocolos ya establecidos que se describen brevemente a continuación.

Diagnóstico por Histología

Para el diagnóstico por histología fue necesario remover a cada abulón de su concha y realizar cortes de tal manera que se pudieran observar secciones trasversales del esófago. Cada corte se colocó individualmente en un casete histológico y posteriormente se fijaron con solución Davidson's, en una relación de volumen de 1:5. La fijación duró 24 horas (Shaw y Battle, 1957). Después de este periodo los tejidos se deshidrataron en un procesador automático de tejidos (Leica, Modelo TP1020), con cambios graduales de etanol (70 % hasta alcohol absoluto) e incluidos en parafina utilizando un incluidor automático de parafina (Leica, Modelo GG1160).

A partir de cada bloque de parafina se obtuvo un corte histológico el cual se realizó en un micrótopo (Spencer, Modelo 820) a 5 µm de espesor y colocado en un portaobjetos. Los cortes fueron utilizados para el análisis histológico convencional utilizando la técnica de Hematoxilina-Eosina/Floxina (Shaw y Battle, 1957; Howard *et al.*, 2004) y montados con resina. Las laminillas histológicas se revisaron en un microscopio compuesto, para determinar la presencia y la intensidad de *X. californiensis* en cada abulón.

Para determinar la intensidad mediante la técnica histológica se consideró el número de inclusiones de bacterias en cada preparación histológica a un aumento de 200x (objetivo 20X), las cuales se enumeraron usando la escala propuesta por Friedman *et al.*, (1997) y modificada por Cáceres-Martínez *et al.*, (2001) (Tabla 1).

Tabla 1. Escala de intensidad de PTR

Nivel	Número de células de PTR	Interpretación
0	0 PTR	No infectado
1	1 a 10 PTR	Infección ligera
2	11 a 100 PTR	Infección moderada
3	101 a 1000 PTR	Infección grave
4	> 1000 PTR	Infección muy avanzada

PCR tiempo final

Fueron utilizados los iniciadores RA 5-1 (5'-GTTGAACGTGCCTTCAGTTTAC-3') y RA 3-6 (5'-ACTTGGACTCATTCAAAGCGGA3') desarrollados específicamente para detectar *X. californiensis*, los cuales amplifican un segmento de 160 pb. de la subunidad menor del ribosoma bacteriano (Andree *et al.*, 2000). La amplificación por PCR se

realizó en un volumen de reacción estándar de 25 μl que contiene 1.5 mM de MgCl_2 , 400 ngml^{-1} BSA, 200 μM de dNTPs, 0.5 mM de cada iniciador, 0.8 unidades de polimerasa *Taqy* 100 ng de DNA. Las mezclas de reacción se colocaron a un termociclador (Veriti $\text{\textcircled{R}}$ Applied Biosystems). El programa para la reacción de amplificación fue: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos a 95°C durante 1 minuto, 62°C durante 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos, con una extensión final a 72°C durante 10 minutos. De cada reacción de PCR se tomó una alícuota para comprobar el producto de amplificación de 160 pares de bases, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio.

Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como la media con su desviación estándar, los cuales fueron utilizados para realizar análisis de varianza (ANOVA) utilizando el paquete estadístico *STATISTICA* versión 8.0. Se fijó el nivel de significancia a $P=0.05$. Posteriormente se realizó la prueba de comparación de medias de Tukey.

Resultados

Análisis histopatológico inicial

Los PTRs se encontraron en todos los abulones (Prevalencia del 100%) con un valor promedio de la intensidad de 2.63. Estas bacterias infectaron las células epiteliales del tracto digestivo, incluyendo el esófago posterior (Fig. 1), asociadas con diferentes grados de daño tisular consistente con la infección por *X. californiensis*. En la Figura 1 A y B se muestra una sección transversal del tracto digestivo que muestra una infección severa, observándose la abundancia de colonias de PTR que adquieren una forma basófila muy intensa provocando hipertrofia celular. En las figuras 1 C, D, E y F se muestra una infección moderada, y se muestra una sección del epitelio del esófago no infectado por la rickettsia (Es) y una zona infectada (Ei).

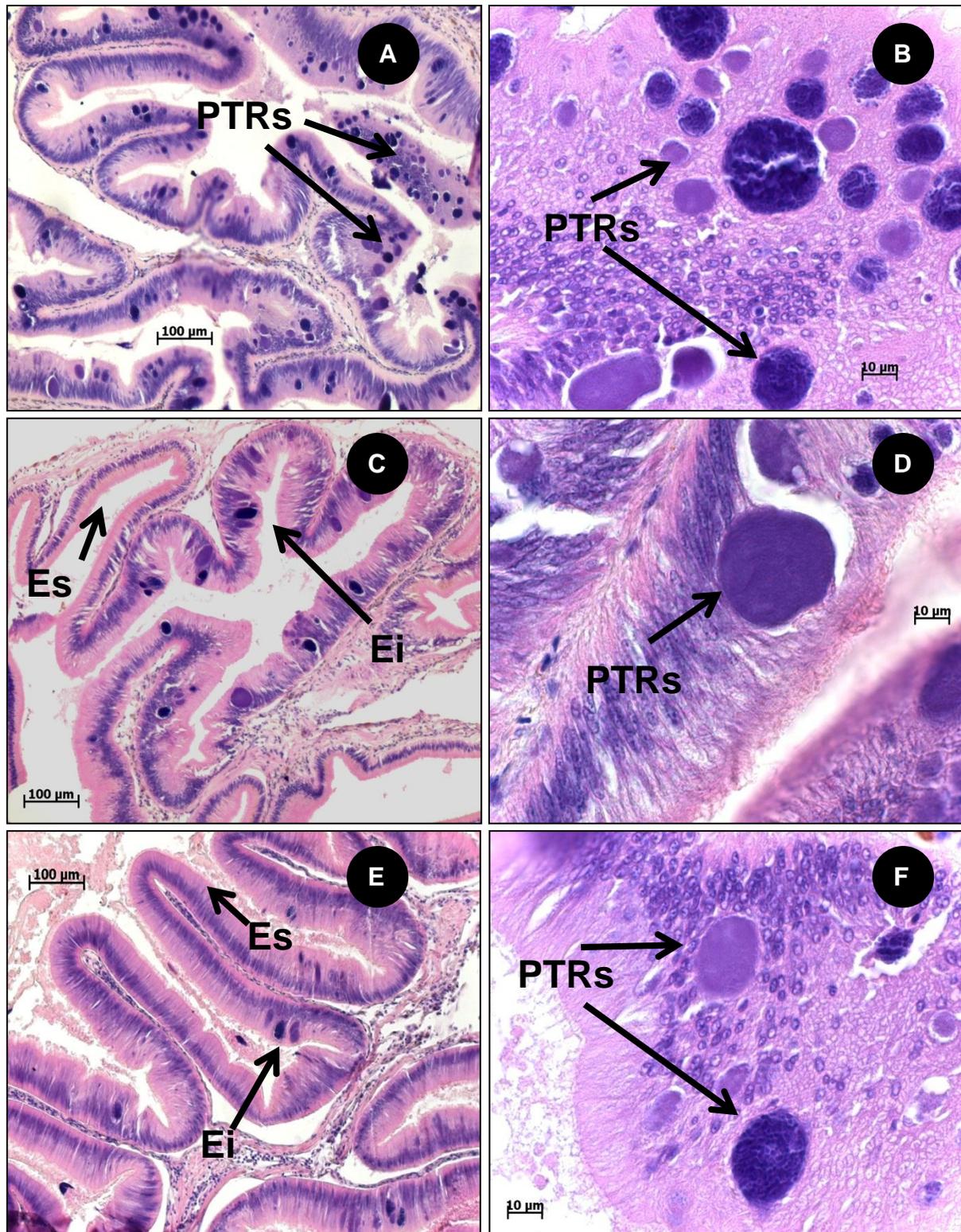


Figura 1A. Imágenes que muestran a *Haliotis rufescens* infectado con *Xenohaliotis californiensis*. En A) Esófago posterior de abulón rojo severamente infectado (+3) por organismos procaríotas del tipo Rickettsiales (PTRs). (B) Colonias de PTR que adquieren una forma basófila muy intensa provocando hipertrofia. (C, D, F y G) Se muestran divertículos digestivos de abulón rojo moderadamente infectado (+2) por PTRs. En C y E se muestra una sección del epitelio del esófago no infectado por la rickettsia (Es) y una zona infectada (Ei).

Ensayos de recuperación

Los baños y las inyecciones de OTC tuvieron un efecto terapéutico significativo ($P < 0.05$) y consistente al día siete, donde el 90 y 88 % de los organismos se incorporaban a su posición normal en menos de un minuto, respectivamente (Fig. 3 y 4). El efecto terapéutico a corto plazo también fue evidente en los ensayos de recuperación, ya que el 100% de los organismos no tratados de ambos grupos necesitaron más de 6 min para voltearse al inicio del experimento (día 0), pero dos semanas después del tratamiento (día 15), el 100% de los organismos tanto de los baños como de las inyecciones, pudieron recuperar su posición normal dentro de los primeros 30 s. Después de 30 días, fue necesario desprender todos los organismos con una espátula debido a su fuerte adhesión a las paredes de los recipientes. Ningún organismo de los dos tratamientos murió durante o después del tratamiento con OTC.

Análisis histopatológico postratamiento

Después del tratamiento con OTC (baños e inyecciones) no se observaron inclusiones de PTR. En la Figura 5 A, C y E se muestran los diferentes cortes de tracto digestivo de los abulones tratados con baños de OTC. Mientras que, en la Figura 5 B, D y F se muestran los diferentes cortes del tracto digestivo de los organismos del tratamiento con inyecciones de OTC.

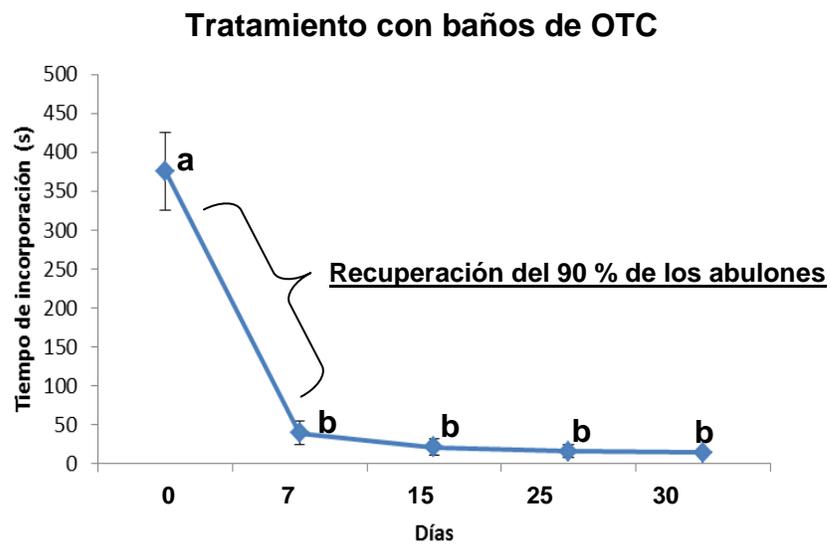


Figura. 3. Incorporación (el tiempo para que un organismo en posición invertida recupere su posición correcta) de los abulones tratados con baños de OTC medida en segundos. Los valores son presentados como la media \pm desviación estándar (DE). El análisis estadístico se realizó mediante el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $P < 0.05$ y se utilizan letras para indicar la inducción significativa. Además, se indica el porcentaje de organismos recuperados los primeros siete días de tratamiento.

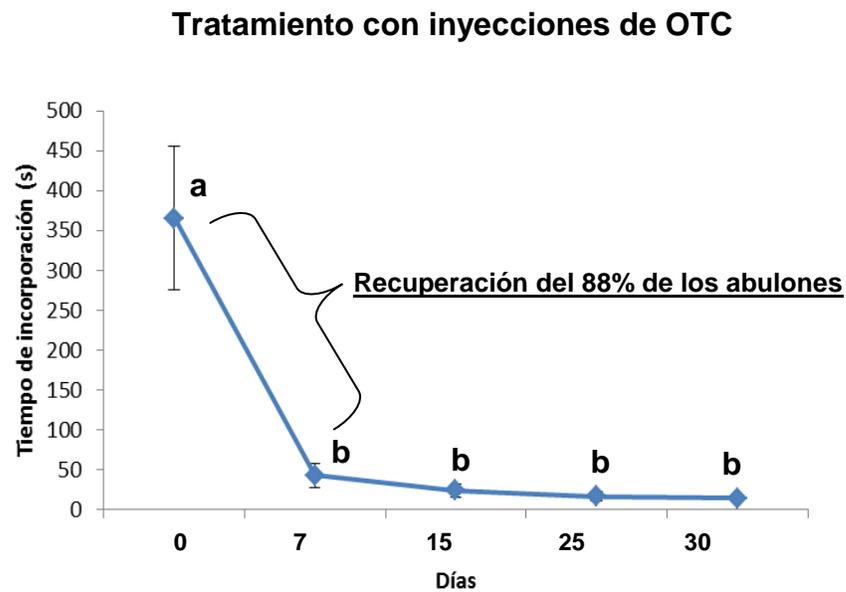


Figura. 4. Incorporación medida en segundos de los abulones tratados con inyecciones de OTC. Los valores son presentados como la media \pm desviación estándar (DE). El análisis estadístico se realizó mediante el análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $P < 0,05$ y se utilizan letras para indicar la inducción significativa. Además, se indica el porcentaje de organismos recuperados los primeros siete días de tratamiento.

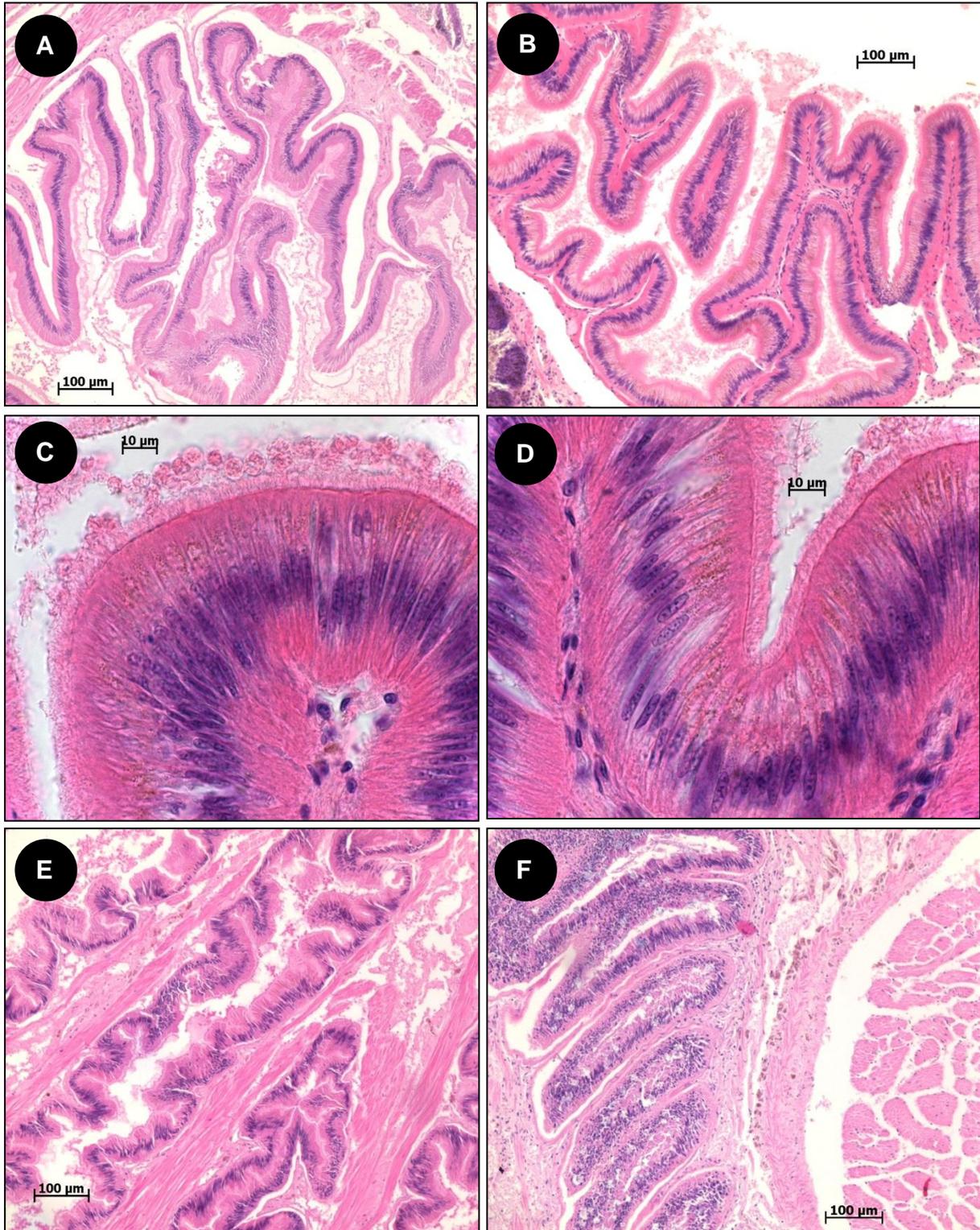


Figura 5A. Cortes histológicos del esófago de *Haliotis rufescens* después de los tratamientos con OTC. En A, C, y E se observan epitelios del esófago no infectados por rickettsias después del tratamiento con baños de OTC. En B, D y F se muestran epitelios del esófago no infectados por rickettsias después del tratamiento con inyecciones de OTC.

Detección por PCR tiempo final

Se llevó a cabo la amplificación de la región hipervariable 1 del gen 16S ribosomal (Andree *et al.*, 2000) de *X. californiensis* en 15 organismos (abulón rojo *H. rufescens*). Se obtuvo un tamaño de fragmento de 160 pb (Fig. 8) en muestras de DNA. La eficiencia de la PCR fue del 93.3%.

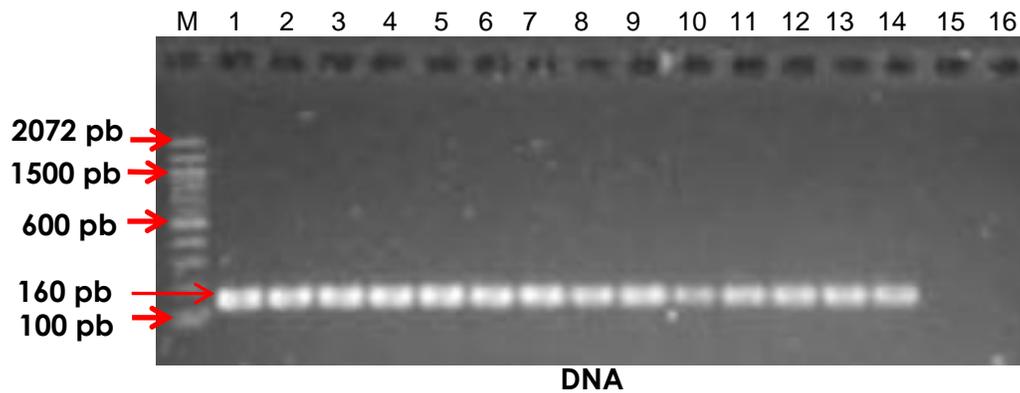


Figura 2A. Detección de *Xenohaliotis californiensis* en *Haliotis rufescens* por PCR con el uso de oligonucleótidos de la región hipervariable V1 16S ribosomal. 1-14) Muestras positivas de *X. californiensis*, 1) Control positivo (ADN genómico de *X. californiensis*, 15) Muestra negativa, 16) Control negativo (agua estéril). M) Marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

Discusión

El presente estudio confirma la eficacia de la administración de OTC tanto en baños como en inyecciones para tratar las infecciones por rickettsias en abulones (con un nivel de intensidad promedio de 2.63) con longitud de la concha de 5.9 ± 0.6 cm y peso vivo de 29 ± 4 g. De acuerdo con Martindale, (1996); Chorpa y Roberts, (2001) OTC es definido como un bacteriostático y no bactericida, por lo cual un individuo medicado requiere de un período para librarse de la infección bacteriana. En el presente estudio, los organismos sometidos para cada tratamiento (con inyecciones y baños de OTC) estuvieron libres de la presencia de *X. californiensis*, considerando: (1) El tiempo de incorporación, (2) la capacidad de los abulones tratados de adherirse a las paredes de los recipientes tan solo siete días después de su aplicación, y (3) el análisis histopatológico postratamiento. Sin embargo, es necesario que estudios futuros se enfoquen a realizar un seguimiento más preciso sobre el efecto del tratamiento durante los primeros días. Lo anterior, debido a que en el presente estudio los resultados de incorporación mostraron evidencia significativa los primeros 7 días del tratamiento (tanto para baños como inyecciones de OTC). Este indicador (tiempo de incorporación) ya ha sido utilizado como criterio práctico para evaluar el grado de recuperación en otros organismos postratamiento (Aquilina y Roberts 2000; Chacón *et al.* 2003; García-Esquivel *et al.*, 2011).

El estudio más recientes en abulones utilizando baños como vía de administración de OTC es el de García-Esquivel *et al.* (2011) donde muestra que es factible usar una razón de $400 \text{ mg OTC L}^{-1}$ en animales con una intensidad promedio de 3.75 (equivalente a $\sim 6.6 \text{ mg g}^{-1}$) como punto de partida para optimizar el empleo de OTC en baños de agua en el tratamiento de la infección por *X. californiensis* en el abulón azul *H. fulgens*. La cantidad anteriormente mencionada es menor a la utilizada en el presente estudio (21.7 mg g^{-1}). Sin embargo, es importante mencionar que la especie utilizada es diferente, así como la talla y el nivel de intensidad promedio de los organismos, siendo necesario realizar una comparación paralela para obtener una evaluación más confiable. Por otro lado, resultados presentados por Moore *et al.* (2001) la administración de OTC en inyección ha demostrado ser eficaz contra la infección por *X. californiensis* una vez que los síntomas clínicos del SD son poco evidentes en el

abulón. En el presente estudio se pudo tratar de manera eficaz a organismos con signos muy visibles del SD utilizando inyecciones de OTC. Estudios futuros deberán de tomar en cuenta la efectividad de los tratamientos con OTC en organismos en donde el daño tisular es muy avanzado (intensidad nivel 4).

En otros trabajos en donde utilizan diferentes métodos de administración de OTC muestran que una dieta que contiene 4.2% de OTC reduce las infecciones bacterianas y la mortalidad del abulón rojo *Haliotis rufescens* cuando se administra durante 14 días, y que el abulón chino (también llamado blanco) *Haliotis sorenseni* fue tratado exitosamente con una dieta medicada con 9% de Terramicina® (=OTC, TM-100 Pfizer) (1.625% de OTC), suministrada a una tasa diaria de 90.82 mg OTC kg⁻¹ de peso corporal durante 20 días (Friedman *et al.* 2003, 2007). Sin embargo, debido a la características de la infección por *X. californiensis* la cual pueden ejercer un efecto negativo sobre el rendimiento fisiológico (tasa de ingestión, metabolismo basal, relación oxígeno/nitrógeno y producción de heces) (González *et al.*, 2012) los baños y las inyecciones con OTC podrían ser más eficientes en el tratamiento de la infección en comparación con dietas medicadas, además de que en estas últimas no se tiene un debido control sobre los residuos de OTC.

La biodisponibilidad de OTC es otro de los puntos importantes que se deben abordar en trabajos posteriores, debido a que presenta limitaciones por a sus propiedades antagónicas en la formación de complejos con iones de metales pesados tales como algunos cationes polivalentes (Ca⁺², Fe⁺², Al⁺³ y Mg⁺²) (Riviere y Spoo 1995), los cuales se pueden encontrar abundantemente en el agua de mar. Sin embargo, la forma de OTC empleada en el presente estudio (clorhidrato de OTC) es conocida por ser soluble en agua sin que pierda sus propiedades bacteriostáticas (FDA, 2006).

A pesar de los buenos resultados del presente estudio, se recomienda realizar experimentos a mediano y largo plazo a fin de descartar la posibilidad de resistencia antibiótica al utilizar baños e inyecciones con OTC, así como también emplear medidas preventivas con el fin de evitar la dispersión de los residuos del antibiótico en el ambiente. Asimismo, y de acuerdo con algunas recomendaciones dadas por García-Esquivel *et al.* (2011), es necesario conocer en un primer plano cuales son las bacterias

que conforman en su mayoría la flora bacteriana de los abulones, para posteriormente estudiar los posibles efectos relacionados con la aplicación de antibióticos.

Referencias bibliográficas

- Andree, K. B., Friedman, C. S., Moore, J. D., & Hedrick, R. P. (2000). A polymerase chain reaction for detection of genomic DNA of a Rickettsiales-like prokaryote associated with Withering Syndrome in black abalone (*Haliotis cracherodii*). *Journal of Shellfish Research*. 19: 213–218.
- Aquilina, B., Roberts, R. (2000). A method for inducing muscle relaxation in the abalone, *Haliotis iris*. *Aquaculture*. 190: 403–408.
- Álvarez-Tinajero, M. del C., Cáceres-Martínez, J., & González-Aviles, J. G. (2002). Histopathological evaluation of the yellow abalone (*Haliotis corrugate*) and the blue abalone (*Haliotis fulgens*) from Baja California, Mexico. *Journal of Shellfish Research*. 2: 825–830.
- Betti, L., Giannaccini, G., Nigro, M., Dianda, S., Gremigni, V., & Lucacchini, A. (2003). Studies of peripheral benzodiazepine receptors in mussels: Comparison between a polluted and a nonpolluted site. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54: 36–42.
- Braid, B., Moore, J. D., Robbins, T. T., Hedrick, R. P., Tjeerdema, R. S., & 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: 219–231.
- Cáceres-Martínez, J. A., Tinoco-Orta, G. (2001). Symbionts of cultured red abalone *Haliotis rufescens* from Baja California, Mexico. *Journal of Shellfish Research*. 20: 875–881.
- Chacón, O., Viana, M. T., Farías, A., Vazquez, A. C., & García-Esquivel, Z. (2003). Circadian metabolic rate and short-term response of juvenile green abalone (*Haliotis fulgens* Philippi) to three anesthetics. *Journal of Shellfish Research*. 22: 415–421.
- Chorpa, I., Roberts, M., (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacteria resistance. *Microbiology and Molecular Biology*. Rev. 65 (2): 232–260.
- Food and Drug Administration. (2006). Freedom of Information Summary, Oxytetracycline Hydrochloride. Recuperado de <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/ucm061757.pdf>

- Friedman, C. S., Thompson M., Chun C., Haaker P. L., & Hedrick R. P. (1997). Withering syndrome of the back abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): Water temperature, food availability, and parasites as possible causes. *Journal of Shellfish Research*. 16: 403–411.
- Friedman, C. S., Andree, K. B., Beauchamp, K., Moore, J. D., Robbins, T. T., Shields, J. D., & Hedrick, R. P. (2000). “*Candidatus Xenohaliotis californiensis*”, a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 847–855.
- Friedman, C. S., Trevelyan, G., Robbins, T. T., Mulder, E. P., & 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: 1–23.
- Friedman, C. S., Biggs, W., Shields, J. D., & Hedrick, R. P. (2002). Transmission of Withering Syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach. *Journal of Shellfish Research*. 21 (2): 817-824.
- Friedman, C. S., (2012). Infection with *Xenohaliotis californiensis*. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Recuperado de www.oie.int/esp/normes/fmanual/2.4.07
- García-Esquivel, Z., Cáceres-Martínez, J. A., & Montes-Magallón, S. (2011). Oxytetracycline water bath treatment of juvenile blue abalone *Haliotis fulgens* (Philippi 1845) affected by the withering syndrome. *Ciencias Marinas*. 37(2): 191–200.
- Gardner, G. R., Harshbarger, J. C., Lake, J. L., Sawyer, T. K., Price K. L., Stephenson, M. D., Haaker P. L., & Togstad, H. A. (1995). Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 66: 111–120.
- González, R. C., Brokordt, K., & Lohrmann. K. B. (2012). Physiological performance of juvenile *Haliotis rufescens* and *Haliotis discus hannai* abalone exposed to the withering syndrome agent. *Journal of Invertebrate Pathology*. 111 (1): 20-6. doi: 10.1016/j.jip.2012.05.00
- Hameed, A. S. S., Raham, K. H., Alagan, A., & Yoganandhan, K. (2003). Antibiotic resistance in bacteria isolated from hatchery-reared larvae and post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. 217: 39–48.

- Howard, D. W., Lewis, E. J., Keller, J., & Smith, C. S. (2004). Histological Techniques for marine bivalve mollusk and crustaceans. In: Kinne, O. (Ed.). NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5. (pp. 1985-1990) Biologische Analt. Helgoland.
- Kismohandaka, G., Roberts, W., Hedrick, R. P., & Friedman, C. S. (1995). Physiological alterations of the black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach, with withering syndrome. *Journal of Shellfish Research*. 14 (1): 269–270.
- Manahan, D. T. (1990). Adaptation by invertebrate larvae for nutrient acquisition from seawater. *American Zoologist*. 30: 147–160.
- Martindale, T. (1996). The Extra Pharmacopoeia. In: Reynolds, J.E.F., (ed.) Royal Pharmaceutical Society. (pp. 259–260). Blackwell Scientific. Oxford, UK.
- Moore, J. D., Robbins, T. T., & 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 Animals Health*. 12: 26–34.
- Moore, J. D., Robbins, T. T., Hedrick, R. P., & Friedman, C. S. (2001). Transmission of the Rickettsiales-like prokaryote “*Candidatus Xenohaliotis californiensis*” and its role in withering syndrome of California abalone *Haliotis* spp. *Journal of Shellfish Research*. 20 (2): 867–874.
- Schnick, R.A., (1998). Approval of drugs and chemicals for use by the aquaculture industry. *Veterinary and Human Toxicology*. 40: 9–19.
- Shaw, B.L., Battle, H.I. (1957). The gross microscopic anatomy of the digestive gland of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Canadian Journal of Zoologist*. 35: 325–346.
- Sommerville, D.(1991). Black abalone studies. Thermal Effects Monitoring Program. 1990 annual report, Diablo Canyon Power Plant. Pacific Gas and Electric Company. 4: 51–62.
- Vilchis, L.I., Tegner, M.J., Moore, J.D., Friedman, C.S., Riser, K.L., Robbins T.T., & Dayton, P.K.(2005). Ocean warming effects on growth, reproduction, and survivorship of southern California abalone. *Journal of Applied Ecology*. 15:469–480

Wright, S.H., Ahearn, G.A. (1997). Nutrient absorption in invertebrates. In: Dantzler WH (Ed.). *Comparative Physiology*. (pp. 1137–1205). Blackwell Scientific. Oxford, UK.

Anexo 3. Extracción de RNA (Evrogen)

Matz, (2002).

1. Disolver el tejido en solución D. La máxima cantidad de tejido a usar debe ser equivalente al 20% del volumen de la solución D. Usar nitrógeno líquido o un tip de pipeta con la punta cortada haciendo movimientos hacia arriba y abajo. 2-3 minutos.
2. Centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a tubo nuevo.
3. Colocar el tubo en hielo y agregar un volumen equivalente de fenol saturado y mezcle. Adicione 20% del volumen total de cloroformo:isoamil (24:1) y dar vortex. Se formarán dos fases. Dar vortex de 3 a 4 veces más con intervalos de 1 minuto entre cada paso y ubicando el tubo en hielo. Centrifugar a máxima velocidad por 30 minutos a 4°C. Recupere la fase acuosa superficial.
4. Repetir el paso 3.
5. Adicione 1 μL de coprecipitante (glucógeno), luego adicione un volumen igual de etanol al 96% y mezclar. Centrifugar inmediatamente a máxima velocidad a temperatura ambiente por 10 minutos. Lavar el pellet con 0.5 mL de etanol al 80%. Secar el pellet brevemente (hasta que no se vea líquido).
6. Disolver el pellet en 100 μL de agua miliQ. Si el pellet no puede ser disuelto completamente, remover los residuos centrifugando la muestra a máxima velocidad por 3 minutos a temperatura ambiente. Transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo, adicione un volumen equivalente de LiCl 12 M y enfríe la solución a -20°C por 30 minutos. Centrifugar a máxima velocidad por 15 minutos a temperatura ambiente. Lavar el pellet con 0.5 mL de etanol al 80%, y secar como se hizo previamente.
7. Disolver el pellet en 40 μL de agua miliQ.
8. Incubar el RNA de 10 a 15 minutos a 60°C para asegurar la completa solubilización y proceda inmediatamente a efectuar las lecturas en espectrofotómetro a 260 y 280 nm. Razones 260/280 deben estar entre 1.8 y 2.0.
9. Estimar la calidad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa/formaldehído desnaturalizante (Sambrook *et al.*, 1989).
10. Para almacenar el RNA aislado, Agregar 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M y 2.5 volúmenes de etanol al 96%. Mezclar fuertemente. La muestra puede ser almacenada por años a -20°C .

Anexo 4. Síntesis de cDNA con SuperScript™ III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™).

El siguiente procedimiento está diseñado para convertir 1 µg hasta 5 µg de RNA total o 1 pg hasta 500 ng de poly(A)⁺RNA en cDNA de primera cadena:

1. Mezclar y centrifugar brevemente cada uno de los componentes antes de usar.
2. Combine lo siguiente en un tubo de 0.2 ó 0.5 mL:

<u>Componente</u>	<u>Cantidad</u>
hasta 5 µg de RNA total	n µl
Primers	1 µl
50 µM oligo (dT) ₂₀ , o	
2 µM primer específico-gen (GSP), o	
50 ng/µl hexámeros aleatorios	
10 mM dNTP mix	1 µl
DEPC- agua	a 10 µl

3. Incubar a 65°C por 5', luego ubicar en hielo por al menos 1'.
4. Preparar la siguiente master mix, **Agregando cada uno de los componentes en el orden indicado:**

<u>Componente</u>	<u>1Rxn (µl)</u>
10X RT buffer	2
25 mM MgCl ₂	4
0.1 M DTT	2
RNaseOUT™ (40 U/ µl)	1
SuperScript™ III RT (200 U/µl)	1

5. Agregar 10 µL de master mix a cada tubo de la mezcla RNA/primers, mezclar suavemente, y colectar por breve centrifugación. Incubar como sigue:

Oligo (dT)₂₀ or GSP: 50 min a 50°C
 hexameros aleatorios: 10 min a 25°C, seguido por
 50 min a 50°C

6. Terminar la reacción a 85°C por 5'. Enfriar en hielo.
7. Colectar las reacciones por breve centrifugación. Agregar 1 µL de RNasa H a cada tubo e incubar por 20' a 37°C.
8. La reacción de síntesis de cDNA puede ser almacenada a -20°C o usada para PCR inmediatamente.

Controles:

1. Diluir el RNA HeLa hasta 100 pg/ μ L con agua DEPC
2. Preparar la mezcla de RNA/primers en un tubo de 0.2 ó 0.5 mL como sigue:

Componente	+RT Control (μ l)	-RT Control(μ l)
Diluir el RNA total HeLa (100 pg/ μ l)	1	1
Oligo (dT) ₂₀	1	1
10 mM dNTP mix	1	1
DEPC- agua	7	7

3. Incubar las muestras a 65°C por 5', luego ubicar en hielo por al menos 1'. Colectar por breve centrifugación y agregar lo siguiente:

Componente	+RT Control (μ l)	-RT Control (μ l)
10X RT buffer	2	2
25 mM MgCl ₂	4	4
0.1 M DTT	2	2
RNaseOUT™(40 U/ μ l)	1	1
SuperScript™ III RT (200 U/ μ l)	1	-
DEPC- agua	-	1

4. Mezclar suavemente y colectar las reacciones por breve centrifugación.
5. Incubar a 50°C por 50'
6. Terminar las reacciones a 85°C por 5'. Enfriar en hielo.
7. Colectar las reacciones por breve centrifugación. Agregar 1 μ L de RNasa H a cada tubo e incubar por 20' a 37°C.
8. Preparar una mezcla de PCR para cada control. Para cada una de las reacciones control, agregar lo siguiente a un tubo de 0.2 mL mantenido en hielo:

Componentes	Volumen (μ l)
Agua-DEPC	38.1
10X buffer de PCR menos Mg ⁺⁺	5
50 mM MgCl ₂ 1.5	
10 mM dNTP mix	1
Control primer forward (10 μ M)	1
Control primer reverse (10 μ M)	1
cDNA control de RNA	2
Taq DNA polimerasa (5 U/ μ l)	0.4
Volumen final	50

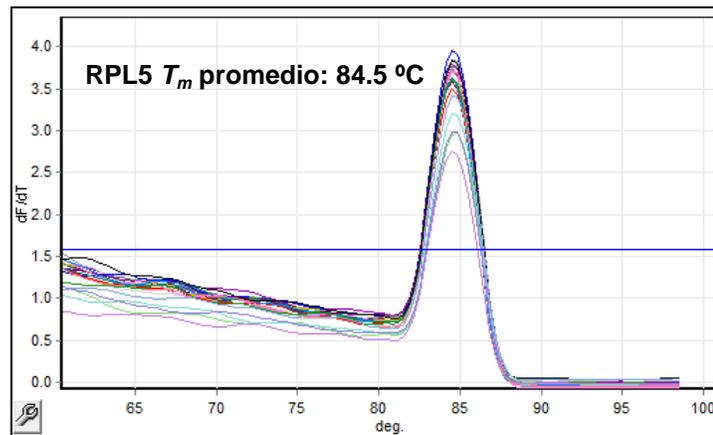
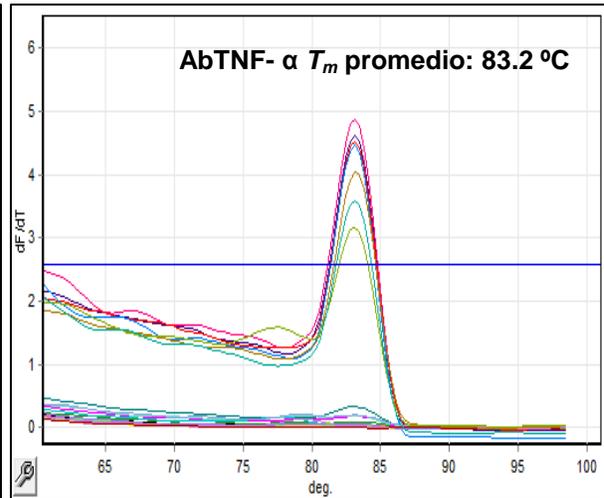
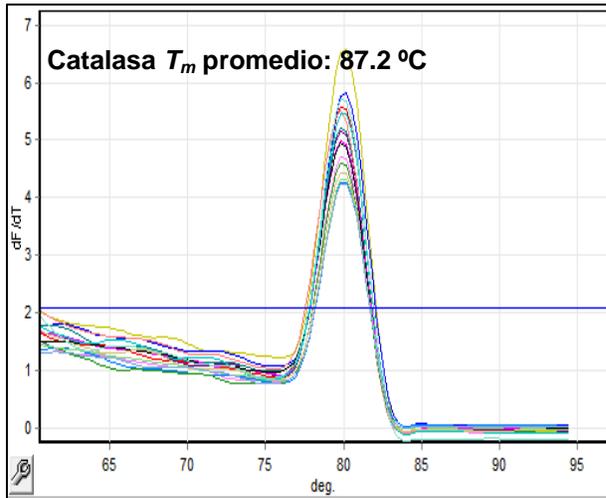
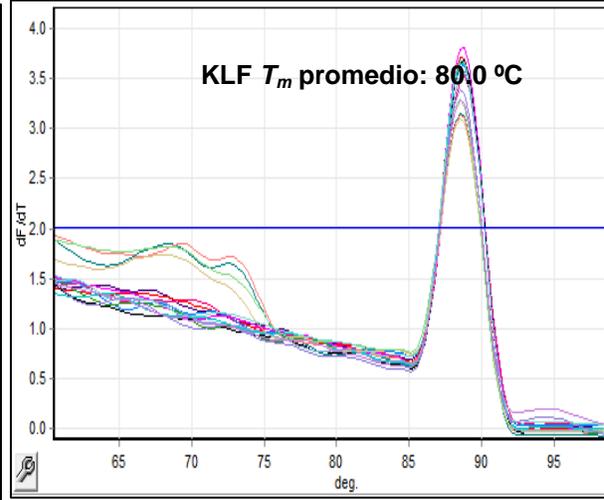
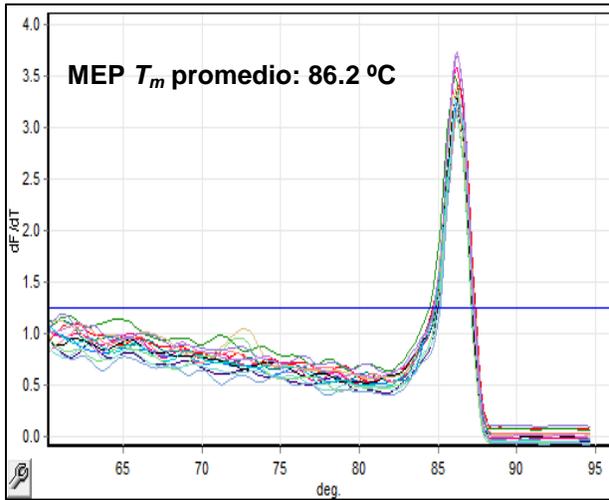
9. Mezclar los contenidos del tubo. Centrifugar brevemente para colectar los componentes de la reacción.

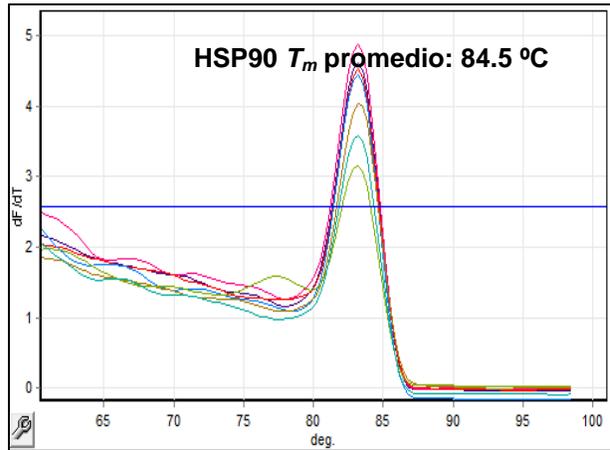
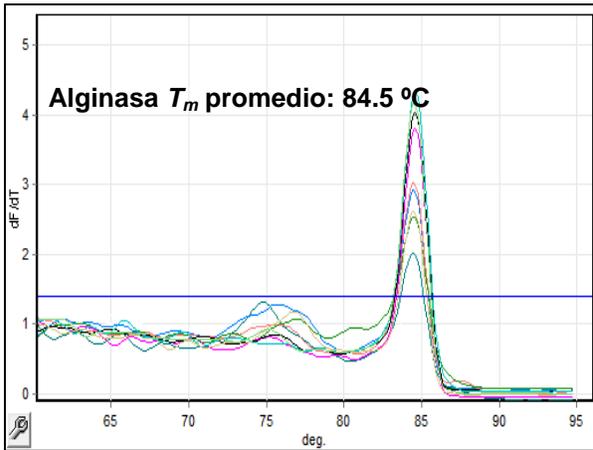
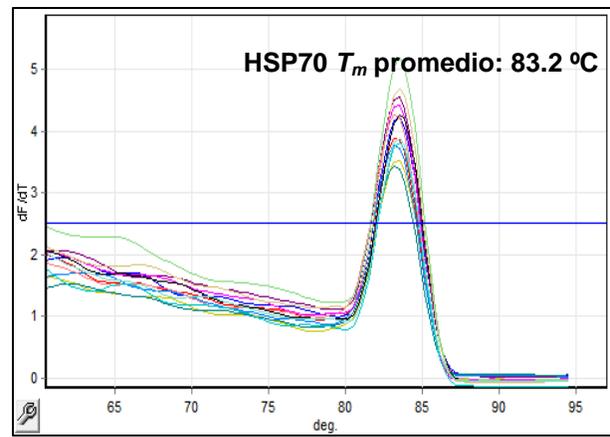
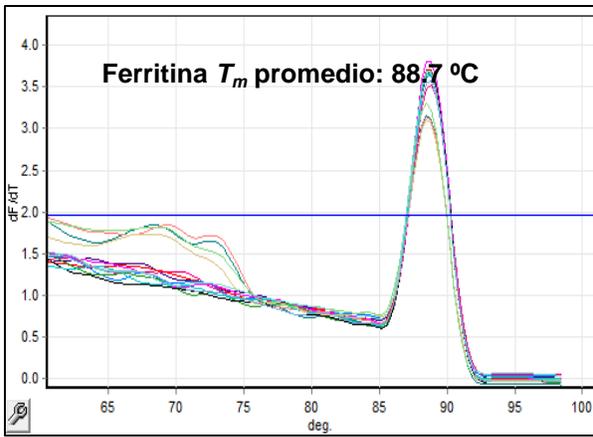
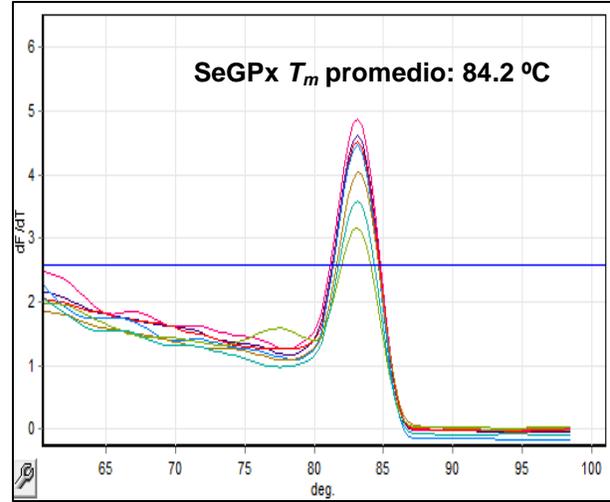
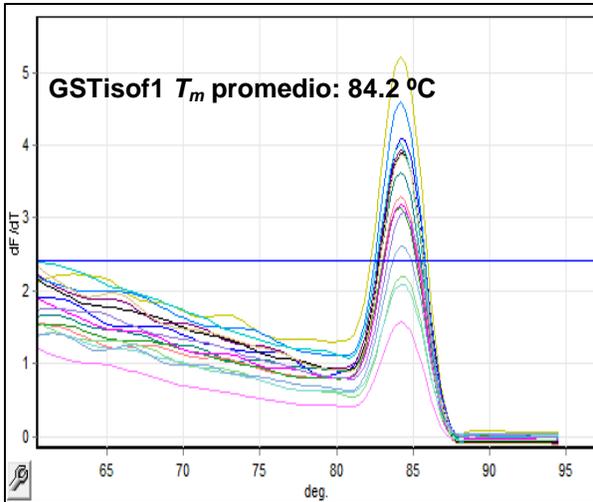
10. Ubicar la mezcla de reacción en un termociclador precalentado (94°C). Realizar un paso de desnaturalización inicial: 94°C por 2'.
11. Realizar 40 ciclos de PCR:

Desnaturalización 94°C por 15 seg
Alineación 55°C por 30 seg
Extensión 68-72°C por 1 min

12. Al completarse, mantener las reacciones a 4°C.

Analizar 10 µL de cada una de las muestras, usando electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Una banda de 353 bp, correspondiente al menos a 25 ng del producto debería ser visible para el control RT+. Ninguna banda debe ser visible para el control RT-.

Anexo 5. Determinación de T_m óptima



Anexo 6. GoTaq® Green Master Mix (Promega)

Aplicación estándar

1. Descongele la GoTaq® Green Master Mix a temperatura ambiente. Vortex a la mezcla maestra, a continuación, girar brevemente en una microcentrífuga para recoger el material en la parte inferior del tubo.
2. Prepare una de las siguientes mezclas de reacción en hielo:

Para un volumen de reacción de 25µl:

Componentes	Volumen(µl)	Conc. final
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12.5	1X
Primer forward, 10µM	0.25-2.5	0.1-1.0 µM
Primer reverse, 10 µM	0.25-2.5	0.1-1.0 µM
DNA	1-5	<250ng
Agua libre de nucleasas	25	N.A.

Para un volumen de reacción de 50µl:

Componentes	Volumen(µl)	Conc. final
GoTaq® Green Master Mix, 2X	25	1X
Primer forward, 10µM	0.5-5.0	0.1-1.0 µM
Primer reverse, 10 µM	0.5-5.0	0.1-1.0 µM
DNA	1-5	<250ng
Agua libre de nucleasas	50	N.A.

3. Si está utilizando un termociclador sin tapa térmica, superponer la mezcla de reacción con 1-2 gotas (Aproximadamente 50 µl) de aceite mineral para evitar la evaporación durante el ciclo térmico. Centrifugar las reacciones en una microcentrífuga durante 5 segundos.
4. Coloque las reacciones en un termociclador que haya sido precalentado a 95 °C. Realizar PCR utilizando los parámetros estándar.

II. Directrices generales para la amplificación por PCR

A. La desnaturalización

Generalmente, una etapa de 2 minutos de desnaturalización a 95 ° C es suficiente. Etapas de desnaturalización posteriores serán entre 30 segundos y 1 minuto.

B. Alineamiento

Optimización de las condiciones de calentamiento mediante la realización de la reacción de partida aproximadamente 5 ° C por debajo de la temperatura de fusión calculada de los iniciadores y el aumento de la temperatura en incrementos de 1 ° C. La etapa de calentamiento es típicamente de 30 segundos a 1 minuto.

C. Extensión

La reacción de extensión se lleva a cabo típicamente a la temperatura óptima para Taq ADN polimerasa, que es 72-74 ° C. Permitir aproximadamente 1 minuto por cada 1 kb de ADN a amplificar. Se recomienda una extensión final de 5 minutos a 72-74 ° C.

Internet: www.promega.com

Anexo 7.

Relación de las 5 secuencias más similares al amplicón obtenido de HSP70 por medio de BLAST.

	Número de Acceso	Descripción	Max score	Total score	Cobertura	Valor E	Max ident
1	JN230827.1	<i>Poecilia reticulata</i> (HSC70) gene, complete cds	58.0	58.0	100%	2e-06	100%
2	JF739182.1	<i>Xiphophorus hellerii</i> heat shock protein 70 (hsp70) mRNA, complete cds	58.0	58.0	100%	2e-06	100%
3	FJ812176.1	<i>Haliotis diversicolor</i> heat shock cognate protein 70 mRNA, complete cds	58.0	58.0	100%	2e-06	100%
4	EF408831.1	<i>Poecilia reticulata</i> heat shock protein hsp70 mRNA, partial cds	58.0	58.0	100%	2e-06	100%
5	DQ324856.1	<i>Haliotis discus hannai</i> heat shock protein 70 mRNA, complete cds	58.0	58.0	100%	2e-06	100%

Única secuencia similar al amplicón obtenido de KLF por medio de BLAST

	Número de Acceso	Descripción	Max score	Total score	Cobertura	Valor E	Max ident
1	EF587285.1	<i>Haliotis diversicolor</i> Kruppel-like factor (KLF) mRNA, partial cds	93.0	95.3	100%	3e-17	98%

Anexo 8. Preparación de la solución fijadora Davidson

Para preparar 1 litro de solución:

Glicerina 100 ml

Formaldehído 37% 200 ml

Etanol 96% 300 ml

Agua de mar filtrada 300 ml

Ácido Acético 100 ml

Agitar antes de usarse

Anexo 9. Técnica de deshidratación

Etanol 70% 1 hora

Etanol 96% - I 2 horas

Etanol 96% - II 2 horas

Etanol 100% - I 2 horas

Etanol 100% - II 2 horas

Etanol 100% - Benceno 3 horas

Benceno I 2 horas

Benceno II 2 horas

Parafina I 2 horas

Parafina II 2 horas

Total 23 horas

Incluir en parafina.

Anexo 10. Técnica de Tinción de Hematoxilina-Eosina/Floxina

Esta técnica permite demostrar claramente un enorme número de diferentes estructuras tisulares. Esencialmente la hematoxilina tiñe al núcleo de la célula de un color azul a negro, con un buen detalle intranuclear; por otro lado, la Eosina tiñe al citoplasma celular y a la mayoría de las fibras del tejido conectivo en varias intensidades de rosa, naranja y rojo.

Desparafinación e Hidratación.

Xileno I 10 min. *

Xileno II 5 min. *

Xileno III 5 min. *

Etanol 100% - I 5 min.

Etanol 100% - II 5 min.

Etanol 96% 5 min.

Etanol 10% 5 min.

Agua destilada

* El Xileno se debe de mantener a una temperatura entre 30°C a 35°C.

Tinción Hematoxilina-Eosina/Floxina.

Desparafinar las muestras hasta hidratar en agua.

Hematoxilina 30 min.

Agua corriente Lavar.

Etanol ácido 5 seg.

Carbonato de litio 2 min.

Agua destilada 5 seg.

Etanol 96% 3 min.

Eosina/Floxina 1 min.

Etanol 96% - I 2 min.

Etanol 96% - II 2 min.

Etanol 100% - I 3 min.

Etanol 100% - II 3 min.

Xileno I 5 min.

Xileno II 5 min.

Xileno III 5 min.

Montar en resina sintética.

Anexo 11. Extracción de DNA “Protocolo con Sales”

Sambrook y Russell, (2001).

ANTES DE COMENZAR:

- Limpiar el mesón de trabajo con Cloro 10% y con alcohol 70%.
- Limpiar el instrumental (pinzas, tijeras, mortero, placas etc.) y mantener cloro, alcohol y agua destilada en vasos precipitados.
- Encender placa térmica a 65°C.
- Limpiar bisturí y pinzas para cada muestra.
- Limpiar el mortero con alcohol al 70% y secar entre cada molienda.

Procedimiento

1. Pesar aproximadamente **30 mg de tejido** dejarlo secar para después depositarlo en un mortero.
2. Triturar el tejido con nitrógeno líquido y depositarlo en **tubos eppendorf de 1.7 mL estéril**. Si no cuentan con nitrógeno se puede cortar el tejido en pequeños trozos y colocarlo en tubos eppendorf.
3. Agregar **500 µl de buffer A** (pH 7.5) y dar vórtex por aproximadamente 10 segundos.
4. Agregar **5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml)** y mezclar invirtiendo varias veces.
5. **INCUBAR LOS TUBOS A 65°C POR 4 HORAS.**
6. Agregar **570 µl de LiCl (6M)** más **230 µl de KAc (5M)** e incubar en hielo por 20 minutos (en refrigerador de -20).
7. Centrifugar 10 min a 10,000 rpm para luego **transferir 900 µl del sobrenadante a un tubo nuevo de 1.7 ml. (EVITE TRANSFERIR MATERIAL PARTICULADO)**. *si se resuspende, vuelva a centrifugar es corregible antes de transferir.
8. Agregar **200 µl de Fenol-Cloroformo**, agitar enérgicamente y centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos. **Extraer 800 µl (aprox.) del sobrenadante y transferir a tubo de 1.7mL.** *si se resuspende, vuelva a centrifugar es corregible antes de transferir.
9. Agregar **550 µl Isopropanol frío** (almacenado a -20°C) y agitar energéticamente.
10. **Centrifugar a 11,000 rpm por 15 min y desechar por completo el sobrenadante. (AQUÍ SE OBSERVA EL PELLETT).**
11. Lavar el pellet con **500 µl de etanol70% frío** (-20°C) por 2 a 3 minutos, realizar un vortex por 10 segundos para soltar el pellet del tubo y luego esperar el tiempo indicado. Centrifugar

a 11,000 rpm por 10 min, desechar por completo el sobrenadante y secar el pellet a temperatura ambiente por 5 minutos máximo. **Los tubos se deben colocar de forma invertida para que el etanol precipite por gravedad.(REPETIR ESTE PASO DOS VECES)**

12. Dejar los tubos abiertos a temperatura ambiente por 5 min para que el exceso de etanol se evapore.
13. Resuspender el pellet en **50 µl agua PCR**.
14. Agregar **1.5 µl de RNAsa (30 µg /mL)** a cada tubo e incubar a 37°C por 40 minutos.
15. Medir la concentración del ADN en el espectrofotómetro Nanodrop, usar 1 ó 1.5 µL de muestra. **NO OLVIDEN HACER EL BLANCO CON AGUA PARA PCR.**
16. Medir calidad de ADN en gel de agarosa al 1% (ladder de 1kb), usar de 1-3 µL de muestra más 3 µL de buffer de carga.

Preparación de Reactivos antes de la extracción:

• Amortiguador A		Para 80 ml
100 mM Tris-HCl pH 7.5	0.969 g	
100 mM EDTA	2.978 g	
100 mM NaCl	0.468 g	
0.5% SDS (p/v)	0.4 g	
Ajustar pH 7.5		

- Cloruro de Litio (6M)
- Acetato de Potasio (5M)
- Proteinasa k (20mg/mL)
- Isopropanol frío (-20°C)
- Etanol 70% frío (-20°C)
- RNAsa (30 ug/mL)
- Agua DEPC o buffer TE.
- Fenol-Cloroformo

Anexo 12. Detección de *X. californiensis* en el abulón por hibridación *in situ*

Antonio *et al.* (1998)

Manejo de la muestra

1. Utilice cortes histológicos de 5 μm de espesor.
2. Desparafine con tres cambios de xileno de 10 minutos cada uno.
3. Hidrate con una serie de cambios de alcohol etílico (100, 100, 95 y 10%) de 5 min. cada uno y lave en agua destilada estéril.
4. Marque cada laminilla con lápiz de solución hidrofóbica alrededor de tejido.
5. Precaliente la solución amortiguadora de Tris-HCl 0.2 M pH 7.2, CaCl_2 2 mM a 37°C y adicione Proteinasa K (20 mg ml^{-1}) a una concentración final de $50 \mu\text{g/ml}$.
6. Adicione 500 μl de la Proteinasa K sobre los cortes histológicos e incube a 37°C por 45 minutos en cámara húmeda.
7. Realice 3 lavados en amortiguador PBS 1X de 5 min. cada uno a temperatura ambiente.

PreHibridación

8. Elimine el PBS de las laminillas. Prepare la solución de prehibridación de acuerdo al número de laminillas, tome en cuenta un control positivo y negativo.

Composición de la solución de pre-hibridación.

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Formamida desionizada 99.5%	500 μl	50%
Solución Salina de Citrato SSC 20X	200 μl	SSC 1X (NaCl 0.15 M, Citrato de sodio 0.015 M, pH 7.0)
ADN de esperma de salmón (10 mg/ml) desnaturalizado a 95°C por 5 minutos.	10 μl	0.1 mg/ml
Sulfato de dextrán (PM 500,000) al 50%	200 μl	10%
Solución Denhardt 100X	10 μl	1X (PVP, BSA y Ficoll al 1%.)
Agua grado PCR estéril	80 μl	-
Volumen total	1 ml	-

9. Coloque 500 μ l de la solución de pre-hibridación e incube por 1 hora, en cámara húmeda, sin cubreobjetos a temperatura ambiente.

Hibridación

10. Descarte la solución de pre-hibridación y lave en SSC 2X por 3 minutos. Deje secar antes de añadir la solución de hibridación.
11. La solución de hibridación contiene los mismos componentes que pre-hibridación excepto ADN de salmón, más las sondas marcadas con DIG (RA5-6, RA3-8, RA3-6 y RA5-1) a una concentración final de 100 fmol/ μ l. Prepare en el momento y proteja de la luz.
12. Precaliente la solución de hibridación en baño María a 90°C. Coloque 500 μ l de la solución de hibridación y desnaturalice a 100°C por 5 minutos. Posteriormente coloque un cubreobjetos estéril libre de ADN e incube toda la noche a 40°C en cámara húmeda.
13. Para remover los cubreobjetos y eliminar la solución de hibridación sumerja las laminillas en amortiguador SSC 2X por 5 minutos y sacuda ligeramente la caja. Lave en SSC 2X por 30 minutos en agitación constante lenta (30 r.p.m.) a temperatura ambiente.
14. Repita el lavado en SSC 2X por 30 minutos.
15. Elimine la solución y realice 3 lavados en SSC 1X de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente.
16. Cambie las laminillas a SSC 0.5X y lave por 10 minutos.
17. Coloque en las laminillas 500 μ L de la solución amortiguadora 1 estéril (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 10 mM) e incube en cámara húmeda por 10 minutos a temperatura ambiente.
18. Prepare la solución de bloqueo: Solución amortiguadora 1 + suero de borrego 2%, Tritón X-100 0.3%).
19. Coloque 500 μ l de la solución de bloqueo e incube 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Dilución de IgG Anti-DIG

20. Diluya el anticuerpo anti-DIG conjugado con FA 1:1000 en solución amortiguadora 1 + suero de borrego 1%, Tritón X-100 0.3%. Prepare en el momento según la cantidad de muestras.
21. Elimine la solución de bloqueo y lave con solución amortiguadora 1 (inmediato). Elimine el exceso de líquido sobre papel secante.
22. Adicione 500 µl del conjugado enzimático diluido a cada laminilla e incube por 3 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.
23. Enjuague las laminillas en solución amortiguadora 1 por 10 minutos con agitación lenta (30 r.p.m.) a temperatura ambiente. Repita el lavado.
24. Agregue a cada laminilla 500 µl de solución amortiguadora 2 (Tris-HCl 100mM pH 9.5, NaCl 100 mM) e incube por 10 minutos a temperatura ambiente.

Preparación del sustrato NBT/BCIP

25. Prepare según la cantidad de muestras. Por ejemplo: use 200 µl del stock y diluya en 10 ml de solución amortiguadora 2. Prepare en el momento y proteja de la luz.

Revelado de la sonda hibridada

26. Agregue a cada laminilla 500 µl del sustrato e incube 4 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda en oscuridad. Revise en el microscopio (10-40X) la formación de precipitados azul intenso.
27. Lave con agua destilada estéril (inmediato) y contra-tiña con Café Y de Bismark 0.05% por 3 minutos como máximo.
28. Lave con agua destilada (inmediato) y deshidrate con 2 cambios de etanol (70 y 100%) por 3 minutos cada uno.
29. Seque las laminillas al aire y monte en resina para su observación.

Descripción de los principales reactivos utilizados en la HIS.

Reactivo	Concentración final
Proteinasa K 20 mg ml ⁻¹ en amortiguador Tris-HCl 0.2M pH 7.2, CaCl ₂ 2 mM	50 µgml ⁻¹
Mezcla de sondas RA5-6, RA3-8, RA3-6 y RA5-1. Stock 100 picomoles µl ⁻¹ de cada una.	4e ⁻⁷ µM µl ⁻¹ (mezcla de las 4 sondas)
Conjugado enzimático: IgG Anti-Digoxigenina (Fracción FAB)-Fosfatasa Alcalina. Concentración: 150 Unidades. Fabricante: Roche, catálogo 11093274910	0.15 U
Cloruro de nitroazul de tetrazolio (NTB) 18.75 mgml ⁻¹ + 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (sal de toluidina) (BCIP) 9.4 mg/ml en dimetil sulfóxido al 67%. Fabricante: Roche, catálogo: 1681451.	NBT 375 µgml ⁻¹ BCIP 188 µgml ⁻¹

Descripción de las sondas utilizadas.

Secuencias	Picomoles totales (síntesis)
RA5-6 5'-GAAGCAATATTGTGAGATAAAGCA-3'(DIG)	17,907
RA3-85'-CCACTGTGAGTGGTTATCTCCTG-3'(DIG)	22,906
RA3-65'-ACTTGGACTCATTCAAAAGCGGA-3'(DIG)	15,895
RA5-1 5'-GTTGAACGTGCCTTCAGTTTAC-3'(DIG)	24,120

Andrée *et al.* (2000).