



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**PARTICIPACIÓN DE Dscam EN EL SISTEMA DE
DEFENSA CONTRA PATÓGENOS EN**

Crassostrea gigas Y C. corteziensis

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

P r e s e n t a

Lilián Arzeta Pino

La Paz, Baja California Sur, septiembre de 2018

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13 horas del día 14 del Mes de Septiembre del 2018, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"PARTICIPACIÓN DE Dscam EN EL SISTEMA DE DEFENSA CONTRA PATÓGENOS EN *Crassostrea gigas* Y *C. corteziensis*"

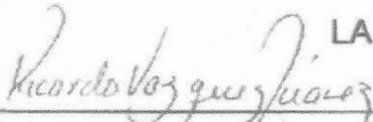


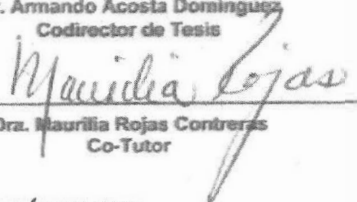

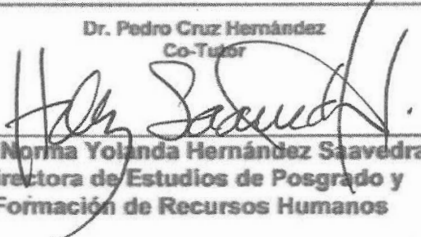
Presentada por el alumno:

Lilián Arzeta Pino

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA

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

LA COMISIÓN REVISORA

 _____ Dr. Ricardo Vázquez Juárez Codirector de Tesis	 _____ Dr. Armando Acosta Domínguez Codirector de Tesis
 _____ Dra. Silvia Alejandra García Gascá Co-Tutor	 _____ Dra. Maurilia Rojas Contreras Co-Tutor
 _____ Dr. Pedro Cruz Hernández Co-Tutor	
 _____ Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra, Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos	

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Codirector de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Armando Acosta Domínguez

Codirector de Tesis

Universidad Sains Malaysia.

Dra. Maurilia Rojas Contreras

Co-Tutor

Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Dra. Silvia Alejandra García Gasca

Co-Tutor

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.

Dr. Pedro Cruz Hernández

Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Comité Revisor De Tesis

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dr. Armando Acosta Domínguez

Dra. Maurilia Rojas Contreras

Dra. S. Alejandra García Gasca

Dr. Pedro Cruz Hernández

Jurado de Exámen

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dr. Armando Acosta Domínguez

Dra. Maurilia Rojas Contreras

Dra. S. Alejandra García Gasca

Dr. Pedro Cruz Hernández

Suplentes

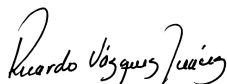
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dr. Pedro E. Saucedo Lastra

Resumen

En insectos y crustáceos el gen de Dscam (molécula de adhesión celular del síndrome de Down) ha sido ampliamente estudiado. La participación de Dscam en el sistema inmune se ha reportado en la mosca de la fruta, camarón, mosquitos, y cangrejos entre otros. El gen Dscam puede dar origen a numerosas isoformas mediante splicing alternativo, con capacidad de responder de manera patógeno-específica. En moluscos bivalvos existe poca información acerca de la expresión, localización, existencia de isoformas y participación en la respuesta frente a patógenos. En este trabajo se logró amplificar todos los dominios de Dscam de *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*. La secuencia de Dscam de *Crassostrea* spp. mostró una organización estructural similar a la descrita en otros invertebrados. Se logró la identificación de dos regiones conservadas que permitieron el diseños de sondas y oligonucléotidos específicos para las técnicas de hibridación *in situ* y PCR cuantitativa (qPCR). Dscam se expresa en branquias y manto de *C. gigas* y *C. corteziensis* sanos. La localización de Dscam en *C. gigas* infectados con herpes virus tipo 1 (OsHV-1) y *C. corteziensis* con *Perkinsus marinus* no se limita a branquias y manto también se observó en intestino, glándula digestiva y gónada. Los resultados de qPCR en *C. gigas* y *C. corteziensis* sanos e infectados sugieren que la expresión de Dscam podría estar relacionada con el patógeno al que fueron expuestos. La expresión de Dscam en branquias infectadas incrementa considerablemente respecto al control en ambas especies. Por otra parte, en manto no se observa diferencia, particularmente en presencia de *P. marinus* se observó una inhibición de la expresión. Para evaluar la participación de Dscam durante la exposición a un patógeno, se midieron los niveles de expresión de Dscam en branquias y manto de *C. gigas* adultos expuestos a *E. coli*. Además se determinaron los niveles de expresión de otros genes de respuesta inmune como FREP, TLR2 e interleucina 17 (IL-17-3). En general, los niveles de expresión de Dscam en manto fueron mayores en comparación con branquias. Los patrones de expresión fueron tejido-específico, en manto, un incremento gradual en la expresión de Dscam se observó de las 0 a 12 h, mientras que en branquias, no se observó un patrón de expresión particular. Los picos de máxima expresión se observaron a las 12 h posteriores en ambos tejidos. Los niveles de expresión de TLR2 fueron altos durante todas las horas evaluadas. La expresión de FREP mostró un increment gradual de 8 h a 24 h en branquias y los niveles de mayor expresión se observaron en manto a las 4, 24 y 48 h. La expresión de IL-17-3 fue baja a las 4 y 8 h en branquias, esta disminución a las 8 h también se observó en manto, sin embargo, los niveles de expresión más altos se observaron después de la inoculación y de manera tardía a las 48 h. Este trabajo proporciona evidencia de la localización de Dscam y su asociación en la respuesta inmune frente a patógenos en especies de ostiones económicamente importantes.

Palabras clave: Dscam, *Crassostrea* spp., Sistema inmune, Patógeno.



Dr. Ricardo Vázquez Juárez

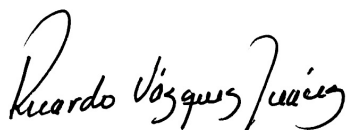


Dr. Armando Acosta Domínguez

Summary

The Dscam (Down syndrome cell adhesion molecule) gene has been widely studied in insects and crustaceans. Its role in immunity has been reported in the fruit fly, shrimp, mosquitoes, bees and crabs, among others. It is known that Dscam potentially gives rise to numerous isoforms by alternative splicing, which are able to respond in a pathogen-specific manner. In bivalve molluscs, information about Dscam expression, localization, isoforms and its role in the immune response is scarce. In this work, the Dscam domains from *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* and *C. sikamea* were amplified. Sequence analysis showed that the structural organization of Dscam from *Crassostrea* spp. was similar to other invertebrates. Two conserved regions were found and used to design specific primers and probes to perform *in situ* hybridization and quantitative PCR (qPCR). Dscam was expressed in gills and mantle from healthy individuals of *C. gigas* and *C. corteziensis*. Dscam localization in *C. gigas* infected with herpes virus type 1 (OsHV-1) and in *C. corteziensis* infected with *Perkinsus marinus* was not limited to gills and mantle, since it was also found in intestine, digestive gland and gonad. Quantitative PCR results in healthy and infected *C. gigas* and *C. corteziensis* suggest that Dscam expression could be related to pathogen exposure. Dscam expression in infected gills increased substantially in comparison with healthy individuals in both species. On the other hand, the mantle showed no differences in Dscam expression; even more, a decreased expression was observed in *C. corteziensis* infected with *P. marinus*. In a controlled bioassay using gills and mantle from adults of *C. gigas* challenged with *Escherichia coli* the expression of Dscam, together with other immune-related genes such as Toll-like receptor, FREP and IL-17-3 was measured by qPCR. In general, the expression levels of Dscam were higher in mantle than in gills. The expression profiles were tissue-specific, in mantle, a gradual increase of expression was observed from 0 to 12 h, while in gills, the expression profile did not show any pattern. A delayed response of Dscam in gills and mantle was observed, with highest expression levels at 12 h post-infection. TLR2 expression levels were higher through all the experiment in both tissues. FREP expression showed a gradual increase from 8 h to 24 h in gills, and the higher expression levels were found in mantle at 4, 24 and 48 h. IL17-3 gene expression was low at 4 and 8 h in gills, this low expression was also found at 8 h in mantle, however, in this tissue a higher expression was observed at early (after inoculation) and late (48 h) time points of infection. This work provides evidence about Dscam localization, and its association to the immune response against pathogens in two economically important oyster species.

Keywords: Dscam, *Crassostrea* spp., Immune system, Pathogen



Dr. Ricardo Vázquez Juárez



Dr. Armando Acosta Domínguez

Dedicatoria

A mis pequeños Jacob y valentina.

A mi esposo por su apoyo y fe infinita.

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, por permitirme el uso de sus instalaciones, acceso a laboratorios, en especial al personal de posgrado por todas las facilidades y apoyo otorgado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (217347).

Al proyecto *¿Existe Inmunidad alternativa adaptativa en Crassostrea spp? El papel biológico de Dscam* (SEP-CONACYT 254648) a cargo del Dr. Ricardo Vázquez Juárez.

A mi comité evaluador por el tiempo, disposición y apoyo brindado, Dra. Alejandra García Gasca, Dra. Maurilia Rojas y el Dr. Pedro Cruz.

A mis Directores de Tesis Dr. Armando y Dr. Ricardo. Especialmente al Dr. Ricardo por la confianza, apoyo, la libertad de proponer y realizar.

Al laboratorio de Genómica y Bioinformática del CIBNOR, Dr. Ricardo gracias por permitirme el uso sin restricción alguna, a la técnico Gabriela Carrión Mendoza por todo el apoyo, charla y abrazos alentadores.

Al laboratorio de Histología e Histoquímica del CIBNOR, especialmente a la Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo y María Eulalia Meza, por todo el apoyo brindado.

Al laboratorio de Fisiología comparada y genómica funcional, a la técnico Patricia Hinojosa por toda la disposición, amabilidad y facilidades otorgadas en el uso de equipos y préstamos de material.

Al laboratorio de fármacos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Concepción, Chile. Particularmente al Dr. Frank Camacho y M. en C. Fátima Reyes, gracias por su calidez y hospitalidad tanto académica como personal.

A mis amig@s, por las charlas, cafés, vinitos e impulso compartido.

A las familias Arzeta-Pino y López-Cruz que sin su apoyo incondicional, el período doctoral no habría llegado a buen término. Mil gracias

A mis padres, hermanas que me acompañan en todo momento.

A mis hijitos y esposo por la paciencia, compañía e inspiración.

Contenido

Resumen.....	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido.....	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas.....	viii
Abreviaturas.....	ix

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del cultivo de moluscos bivalvos.....	1
1.2 Evolución y componentes del sistema inmune de moluscos bivalvos	2
1.3 Presencia de patógenos en <i>Crassostrea</i> spp	4
1.4 Modelos de estudio.....	6
1.5 Descubrimiento de DSCAM en humano (<i>Homo sapiens</i>)	7
1.6 Dscam en invertebrados.....	7

2. ANTECEDENTES.....

3. JUSTIFICACIÓN

4. HIPÓTESIS.....

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

5.2 Objetivos específicos

6. MATERIALES Y MÉTODOS.....

6.1 Ensayos *in silico*

6.2 Ensayos experimentales

6.2.1 Características y procedencia de los individuos de estudio

6.2.2 Purificación de ADN y detección de patógenos

6.2.3 Extracción de ARN

6.2.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

6.2.5 Amplificación de Dscam

6.2.6 Hibridación *in situ* (H. *in situ*)

6.2.7 Síntesis de sondas

6.2.8 Marcaje de sondas

6.2.9 Preparación de las laminillas e H. *in situ*

6.2.10 Evaluación de la expresión de Dscam por PCR cuantitativa.....

6.2.11 Evaluación de la expresión de Dscam durante la exposición a *E. coli*

6.2.12 Análisis estadístico

7. RESULTADOS.....

7.1 Identificación y caracterización del transcrito de Dscam en diferentes tejidos provenientes de *C. gigas* y *C. corteziensis*.....

7.2 Localización de Dscam en los tejidos de *C. gigas* y *C. corteziensis* por H. *in situ*.....

7.3 Determinación de los niveles de expresión génica de Dscam en branquias y manto de <i>C. gigas</i> y <i>C. corteziensis</i>	48
7.4 Evaluación de la expresión de genes inmunes durante la exposición a <i>E. coli</i>	51
8. DISCUSIÓN	55
9. CONCLUSIONES	62
10. LITERATURA CITADA	64
11. ANEXOS	73
Anexo A.....	73
Anexo B.....	77
Anexo C.....	87

Lista de Figuras

Figura 1. Comparación de dominios de DSCAM de <i>Drosophila</i> y humano (<i>Homo sapiens</i>)	8
Figura 2. Comparación de la estructura de Dscam en diferentes grupos taxonómicos.....	9
Figura 3. Análisis electroforético del ARN total	32
Figura 4. Amplificación por PCR del gen β -actina	33
Figura 5. Amplificación por PCR de los dominios de Dscam en <i>Crassostrea gigas</i>	34
Figura 6. Amplificación por PCR de los dominios restantes de Dscam en <i>Crassostrea gigas</i>	35
Figura 7. Amplificación por PCR de los dominios de Dscam en <i>Crassostrea corteziensis</i>	36
Figura 8. Amplificación por PCR de los dominios restantes de Dscam en <i>Crassostrea corteziensis</i>	36
Figura 9. Amplificación por PCR de los dominios de Dscam en <i>Crassostrea sikamea</i>	37
Figura 10. Región conservada localizada en el péptido señal y el dominio Ig1.....	40
Figura 11. Región conservada localizada en el dominio transmembrana y tallo citoplasmático.....	41
Figura 12. Amplificación por PCR de las sondas A y G	42
Figura 13. Comparación de la intensidad de señal de Dscam por hibridación <i>in situ</i> en tejido de manto infectado de <i>Crassostrea gigas</i> (200X).	43
Figura 14. Señal de Dscam en los tejidos de branquias y manto (200X).....	44
Figura 15. Expresión de Dscam en los tejidos de glándula digestiva e intestino	46
Figura 16. Tinción de hematoxilina-eosina en branquias y manto de <i>Crassostrea gigas</i> y <i>Crassostrea corteziensis</i>	47
Figura 17. Análisis electroforético de los genes de referencia	48
Figura 18. Estabilidad de los genes de referencia en branquia y manto de <i>Crassostrea</i> spp	49
Figura 19. Expresión de Dscam en branquias y manto de <i>Crassostrea gigas</i> y <i>C.corteziensis</i>	50
Figura 20. Efecto de la infección por <i>E. coli</i> en la expresión de genes inmunes en branquias de <i>C. gigas</i>	52
Figura 21. Efecto de la infección por <i>E. coli</i> en la expresión de genes inmunes en manto de <i>Crassostrea gigas</i>	54
Figura 22. Análisis electroforético de la amplificación de las regiones de Dscam	74
Figura 23. Posibles clonas positivas con la construcción con el inserto de la región 1-5 de Dscam	75
Figura 24. Posibles clonas positivas con la construcción con el inserto de la región 1-5 de Dscam	75

Lista de Tablas

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para amplificar genes de referencia y regiones conservada y variables del transcrito de Dscam	27
Tabla II. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación por PCR de Dscam en <i>Crassostrea</i> spp	31
Tabla III. Secuencias conservadas dentro del transcrito de Dscam en <i>Crassostrea</i> spp localizadas en la región que amplifica para el péptido señal y el dominio Ig1.....	38
Tabla IV. Secuencias conservadas dentro del transcrito de Dscam de <i>Crassostrea</i> localizadas en la región que amplifica el dominio TM y el tallo citoplasmático	39
Tabla V. Tejido con señal positiva a Dscam en <i>Crassostrea</i> spp	45

Abreviaturas

DSCAM:	Molécula de adhesión celular del síndrome de Down
EF-1:	Factor de elongación 1 alfa
FN:	Fibronectina
GAPDH:	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
H. <i>in situ</i> :	Hibridación <i>in situ</i>
Ig:	Inmunoglobulina
IL:	Interleucina
PAMPS:	Patrones moleculares asociados a patógenos
qPCR:	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RPL13:	Proteína ribosomal L-13
RPL9:	Proteína ribosomal L-9
RT:	Retrotranscripción
TLR:	Receptor tipo toll
TM:	Transmembrana
Tub-a:	Tubulina alfa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del cultivo de moluscos bivalvos

La creciente demanda de organismos marinos a nivel mundial ha llevado a la búsqueda de mejoras en los procesos de producción y procesamiento. Dentro de los organismos con mayor demanda, sin importar su alto costo, están los moluscos bivalvos, entre los que se encuentran los ostiones (FAO, 2012). Francia, el principal productor a nivel mundial, así como otros países europeos disminuyeron su producción en los últimos años debido al incremento en los episodios de mortalidad, dando lugar al surgimiento de nuevos productores en el mercado como México (FAO, 2012).

México se encuentra dentro de los primeros 10 productores de ostiones a nivel mundial. Se calcula que se producen 10 toneladas de ostión anualmente, de los cuales el 90% de la producción corresponde al cultivo de *Crassostrea virginica* en el Golfo de México. En la región del Noroeste, que incluye los estados de Baja California, Baja California Sur, Sinaloa y Nayarit se cultivan las especies de *C. gigas*, *C. sikamea* y por último la especie nativa *C. corteziensis*. La presencia de mortalidades inusuales reportadas desde 1997 ha afectado la producción de *C. gigas* y *C. corteziensis* ocasionando pérdidas económicas (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013).

Además de su importancia económica, los ostiones juegan un papel importante en términos ecológicos del ambiente marino, ya que participan en el mantenimiento de la calidad del hábitat, realizan funciones de filtración y control de biotoxinas, además de funcionar como reservorios de microorganismos patógenos que pueden ocasionar pérdidas dentro de su especie y de organismos asociados a ellos (Sokolova, 2009; Zannella *et al.*, 2017).

1.2 Evolución y componentes del sistema inmune de moluscos bivalvos

Los moluscos bivalvos están constantemente expuestos a patógenos (protistas, parásitos, virus y bacterias) por desarrollarse en ambientes con factores estresantes, tanto bióticos como abióticos. La constante necesidad de ampliar la capacidad de reconocimiento a patógenos derivó en la evolución de los componentes del sistema inmune innato (Bacheré *et al.*, 2004; Du Pasquier, 2006). La teoría de la evolución menciona, entre otras cosas, que la selección natural favorece una defensa altamente específica siempre y cuando el beneficio no supere el costo genético (Frank, 2000; Schmid-Hempel, 2005). Las alteraciones en la distribución genómica, así como en los procesos de desarrollo y señalización celular, originan dicho costo (Schulenburg *et al.*, 2007). La evolución “prueba” modificaciones hasta encontrar cambios favorables; la interacción huésped-patógeno promueve el hallazgo de dicho cambio para mejorar la especificidad en la respuesta del huésped (Daugerthy y Malik, 2012). Los invertebrados carecen de un sistema inmune adaptativo, es decir, no tienen la capacidad de producir anticuerpos específicos ni memoria inmunológica. Sin embargo, los procesos evolutivos les confirieron otros mecanismos para aumentar la especificidad en el reconocimiento a patógenos, tales como el aumento de la diversidad mediante splicing alternativo, duplicaciones, ganancia o pérdida de función, recombinación, cambio de dominios, retrotransposición y conversión de genes (Buchman *et al.*, 2014; Du Pasquier, 2006; Schulenburg *et al.*, 2007). Debido a la eficiencia y especificidad encontrada en dichos mecanismos de respuesta del sistema inmune, actualmente se le denomina como “inmunidad innata con especificidad”, que en términos generales, alude a una respuesta incrementada y eficiente frente a un patógeno previamente conocido (Ng *et al.*, 2014; Schulenburg *et al.*, 2007). Un análisis detallado del genoma de *C. gigas* mostró que son pocos los genes que codifican para las moléculas que efectúan la respuesta inmune innata, pero éstas exhiben una gran especificidad, producto de duplicaciones a gran escala y divergencia en familias de genes con función inmune (Zhang *et al.*, 2015). Algunas familias de genes de respuesta inmune que aumentaron el

número de sus genes codificantes mediante procesos de diversificación son: los receptores tipo Toll, proteínas relacionadas a dominios de unión Toll/Interleucina 1, componentes relacionados a la vía de RIG-1, factor de necrosis tumoral, receptores tipo NOD, proteínas de reconocimiento a peptidoglucanos, proteínas de unión a bacterias Gram negativas, proteínas que contienen dominios de fibrinógeno (FREP) y miembros del complemento, entre otras (Zhang *et al.*, 2015). Se ha descrito que la expresión de los genes de respuesta inmune puede ser modulada por factores tanto bióticos como abióticos que enfrentan los moluscos bivalvos. De esta manera, el sistema inmune innato en *C. gigas* refleja una alta complejidad, capacidad discriminativa y eficiencia en la respuesta a patógenos y a factores ambientales (Zhang *et al.*, 2015).

El sistema inmune es una red de comunicación compleja y específica entre receptores y efectores (Litman *et al.*, 2008). De manera general, el sistema inmune de los moluscos bivalvos tiene como primera línea de defensa barreras fisicoquímicas que evitan la entrada de agentes externos, sus componentes son la concha, mucus y el epitelio. La segunda línea de defensa está constituida por una respuesta de tipo celular a cargo de los hemocitos, que se dividen en granulocitos, semigranulares y agranulares (Wang *et al.*, 2017). Los hemocitos exhiben la capacidad de fagocitar, los granulocitos son los que realizan esta función principalmente en respuesta a infección (Cajaraville y Pal, 1995; Fisher y Tamplin, 1988). El proceso fagocítico involucra la atracción de patógenos vía quimiotaxis, anclaje, endocitosis y degradación. Se ha descrito que la respuesta frente a patógenos involucra tres procesos, infiltración de hemocitos al sitio del daño, nodulación y encapsulación (De Vico y Carella, 2012; Rowley y Powell, 2014). Finalmente una respuesta de tipo humoral, que incluye citosinas, enzimas lisosomales, aglutininas, péptidos antimicrobianos y lectinas, entre otros (Gosling, 2015; Sokolova, 2009).

1.3 Presencia de patógenos en *Crassotrea* spp.

Los eventos de mortalidad ocurren de manera natural en todo hábitat, sin embargo, la intensidad y recurrencia de estos eventos está condicionada por diversos factores, como los cambios en las condiciones ambientales, incrementos de temperatura, disponibilidad de alimento y uno de los más importantes, la presencia de microorganismos patógenos (Chaney y Gracey, 2011; Pernet *et al.*, 2014; Zannella *et al.*, 2017). Hasta hace algunos años la presencia de patógenos en *C. gigas* era considerada poco relevante, a pesar de que se identificaban lesiones por virus, bacterias y protistas. El papel de los patógenos tomó relevancia hasta los acontecimientos de mortalidad masiva observados en Francia a partir del 2008, e incrementándose en 2009 y 2010 (Segarra *et al.*, 2010). Acontecimientos similares, asociados a la identificación de la variante 1 del virus herpes (OsHV-1) se suscitaron en Italia, Irlanda, Reino Unido, España, Nueva Zelanda, Australia, Estados Unidos de Norteamérica y Corea (Chaney y Gracey, 2011; Dégremont, 2013; Green *et al.*, 2016). En México se ha reportado que la presencia de infecciones por OsHV-1 ha ocasionado pérdidas importantes en el cultivo de *C. gigas* (Vásquez-Yeomans y Cáceres-Martínez, 2004; Escobedo-Fregoso *et al.*, 2013).

Existen numerosas especies de bacterias causantes de enfermedad en moluscos bivalvos. Dentro del grupo de Gram negativas destacan las especies del género *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. splendidus*, *V. anguillarum*, *V. aestuarianus*, entre otras), en menor asociación están las de los géneros *Pseudomonas* y *Aeromonas* (Garnier *et al.*, 2008; Kwan *et al.*, 2015). Se ha reportado que *V. splendidus* y *V. aestuarians* ocasionaron mortalidades masivas de *C. gigas* en Francia (De Lorgeril *et al.*, 2011; Pernet *et al.*, 2014). En cuanto a Gram positivas, el principal patógeno de este grupo es *Nocardia crassostreae* causante de nocardiosis en *C. gigas* (Friedman *et al.*, 1991).

La presencia de coliformes como *Escherichia coli* en moluscos bivalvos, está asociada principalmente al vertimiento de aguas contaminadas en cuerpos de agua salada (Derolez *et al.*, 2013; Vega *et al.*, 2013). En el Golfo de Nicoya, Costa Rica, se identificó *E. coli* en cultivos de *C. gigas* y se estableció un vínculo de la presencia del coliforme con la descarga de agua contaminada proveniente de las ciudades costeras cercanas (Vega y Marín, 2014). También se ha reportado la presencia de *E. coli* en individuos de *C. commercialis* colectados durante días de lluvia, lo que sugiere que el arrastre de agua contaminada afecta las áreas asignadas al cultivo de ostiones (Eyles *et al.*, 1984).

Por otra parte los protistas *Perkinsus marinus*, *P. olsenii*, *Marteilia refringens*, *Bonamia ostreae* y *B. exitiosa* han sido asociados a enfermedades en diversos países como Canadá, Estados Unidos de Norteamérica, Irlanda, Australia y España, entre otros. El transporte de bivalvos está bajo vigilancia de las autoridades sanitarias. La presencia de algunas especies de *Perkinsus* spp. y *Halosporium* spp. también se han asociado a eventos de mortalidad masiva en países del continente Americano (Gueguen *et al.*, 2003). Se ha establecido que los episodios causados por protistas son más frecuentes e intensos en períodos con elevadas temperaturas y altas tasas de salinidad (Queiroga *et al.*, 2015).

La distribución de *P. marinus* abarca las costas del este de Estados Unidos, el Golfo de México hasta la península de Yucatán y el Pacífico de México. Su presencia ha causado mortalidad de *C. virginica*, en áreas dedicadas a su cultivo. En México el primer reporte de *P. marinus* como agente causante de mortalidad se dio en 1950 en el estado de Tamaulipas, donde se observaron pérdidas importantes de *C. virginica*; se ha sugerido que dicha infección tuvo origen en el Golfo de México y fue el traslado de especies infectadas las que transmitieron el patógeno a organismos del Noroeste del país (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013).

En el 2006, se identifica por primera vez *P. marinus* en la especie nativa *C. corteziensis* en el estado de Nayarit sobre la costa del Pacífico. Hasta el momento la intensidad e

incidencia de dicho protista se ha asociado al incremento de la temperatura y niveles de salinidad (Cáceres-Martínez *et al.*, 2016). Posteriormente, se reportó el hallazgo de *P. marinus* en Tamaulipas (Aguirre-Macedo *et al.*, 2007), Veracruz, Tabasco y Campeche (Gullian-Klanian *et al.*, 2008) cabe mencionar que en dichos estados no existe asociación de *P. marinus* con eventos de mortalidad. En años recientes, *P. marinus* también se ha detectado en *C. gigas* cultivados en el Golfo de California (Enríquez-Espinosa *et al.*, 2010). Actualmente se desarrollan estudios para establecer la resistencia o susceptibilidad de este nuevo hospedero (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2008; Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013).

1.4 Modelos de estudio

En este proyecto se estudiaron dos especies de moluscos bivalvos de importancia comercial en el Noroeste del país, *C. gigas* y *C. corteziensis*.

C. gigas es la especie de mayor distribución mundial, fue introducida en la década de los 70's en Baja California Sur, por años había sido cultivada de manera artesanal, lo cual ha cambiado debido a su gran aceptación y creciente demanda. Es una especie de gran adaptabilidad y rápido crecimiento. Se han probado distintas estrategias para la tecnificación y modernización del proceso de producción, que garanticen la obtención de moluscos bivalvos inocuos para el consumo humano e incrementen su participación en el mercado a nivel mundial (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013; Mazón, 1996).

Por otra parte *C. corteziensis* es una especie nativa de la región, de clima cálido, que posee gran adaptabilidad a cambios en su hábitat y presenta un corto período de crecimiento, con una importante tendencia de aumento en su producción, principalmente en el estado de Nayarit (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013; SEMARNAT 2014).

1.5 Descubrimiento de DSCAM en humanos (*Homo sapiens*)

El gen de DSCAM (molécula de adhesión celular del síndrome de Down) fue identificado por primera vez en humanos en la región 21q22.2-22.3 del cromosoma 21, dentro de un grupo de genes sobreexpresados y determinantes para el desarrollo de retraso mental y daño intestinal en pacientes con Síndrome de Down (SD)(Yamakawa *et al.*, 1998). La secuencia de aminoácidos presenta un 47% de identidad en secuencia y estructura con múltiples proteínas miembros de la súper familia de las inmunoglobulinas, que participan en procesos de desarrollo neuronal, incluyendo migración celular, extensión de axones, fasciculación y mielinización como es el caso de CAM L1 (Dickson *et al.*, 2012; Yamakawa *et al.*, 1998), otras que participan en la formación y mantenimiento de la red de neuronas como BIG-1 y BIG-2 (Yoshihara *et al.*, 1994). Estos hallazgos llevaron a la denominación de esta nueva molécula como DSCAM, debido a su estructura y participación en el desarrollo del sistema nervioso en pacientes con SD (Yamakawa *et al.*, 1998).

1.6 Dscam en invertebrados

Algunas familias de proteínas han desarrollado un sistema especializado de splicing alternativo para cubrir estas necesidades de diversificación (Hattori *et al.*, 2007), como las neurexinas y algunos miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, como el homólogo DSCAM en *Drosophila*, que, puede generar teóricamente miles de isoformas con diferente capacidad de reconocimiento en el sistema nervioso y en el sistema inmune de insectos (Wojtowicz *et al.*, 2004; Zispusky *et al.*, 2010).

El splicing alternativo es un proceso por el cual el ARN maduro puede dar origen a diferentes variantes, en donde puede haber extensión o acortamiento, salto o inclusión de exones o retención de secuencias intrónicas (Kelemen *et al.*, 2013; Richard *et al.*, 2010). A partir de este proceso se generan múltiples moléculas de ARN mensajero (ARNm) maduro

provenientes de un sólo gen, aumentando la diversidad proteómica (Kelemen *et al.*, 2013). El proceso de splicing alternativo es clave en la regulación de la expresión de genes, que cambia bajo determinadas condiciones fisiológicas, permitiendo a los organismos responder al ambiente (Kelemen *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2004).

La primera descripción de la proteína Dscam en invertebrados surgió en *Drosophila*, durante el estudio de la vía de señalización de Dock, una proteína adaptadora con dominios SH2/SH3 que une a Pak. Pak a su vez se une a miembros de la familia de Rho GTPasas las cuales inician su vía de señalización para promover cambios en el citoesqueleto, necesarios para el desarrollo de la guía del axón. En este estudio se sugiere por primera vez a Dscam como receptor, proponiendo que reconoce señales guía extracelulares y por consiguiente induce la unión a dominios de Dock que une a Pak y las Rho GTPasas, actuando de manera conjunta para dirigir la vía de señalización del nervio de Bolwig (Schmucker *et al.*, 2000).

Los análisis comparativos de la proteína Dscam entre *Drosophila* y humano revelaron que el número y organización de los dominios extracelulares, son idénticos. A nivel de secuencia, mostraron un 32% de identidad y 49% de similitud. La estructura de la proteína Dscam consta de dominios de inmunoglobulinas (Ig), fibronectina tipo III (FNIII) y transmembrana (TM) (Fig. 1) (Schmucker *et al.*, 2000).

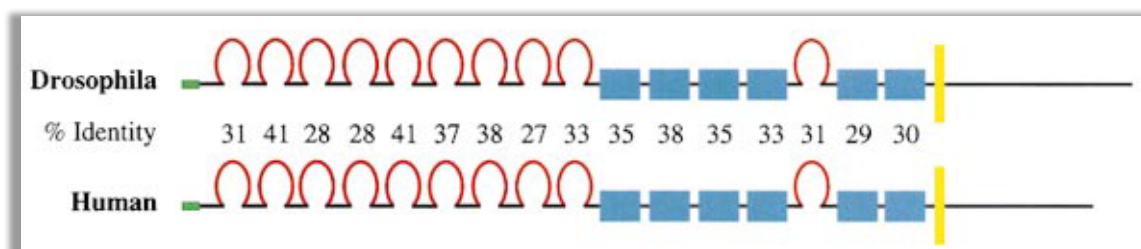


Figura 1. Comparación de dominios de DSCAM de *Drosophila* y humano (*Homo sapiens*). Se muestra la organización de Dscam así como el porcentaje de identidad entre los dominios, obtenidos a partir del análisis de secuencia. Tomado de Schmucker *et al.* (2000).

La proteína Dscam muestra una estructura conservada en diferentes organismos, a partir del extremo N-terminal se localizan en orden los siguientes dominios, nueve de inmunoglobulina, tres de ellos son variables (dominios 2, 3 y 7) que pueden dar origen a miles de isoformas mediante splicing alternativo, cuatro de FNIII, uno de inmunoglobulina, dos de FNIII, un dominio TM (puede presentar splicing alternativo) y finalmente un tallo citoplasmático en el extremo C-terminal, estos dos últimos pueden estar ausentes como se ha observado en el crustáceo *Litopenaeus vannamei* (Fig. 2) (Brites *et al.*, 2008; Chiang *et al.*, 2013; Chou *et al.*, 2009; Hattori *et al.*, 2007; Schmucker *et al.*, 2000; Schmucker y Chen, 2009; Watson *et al.*, 2005; Watthanasurorot *et al.*, 2011; Yamakawa *et al.*, 1998).

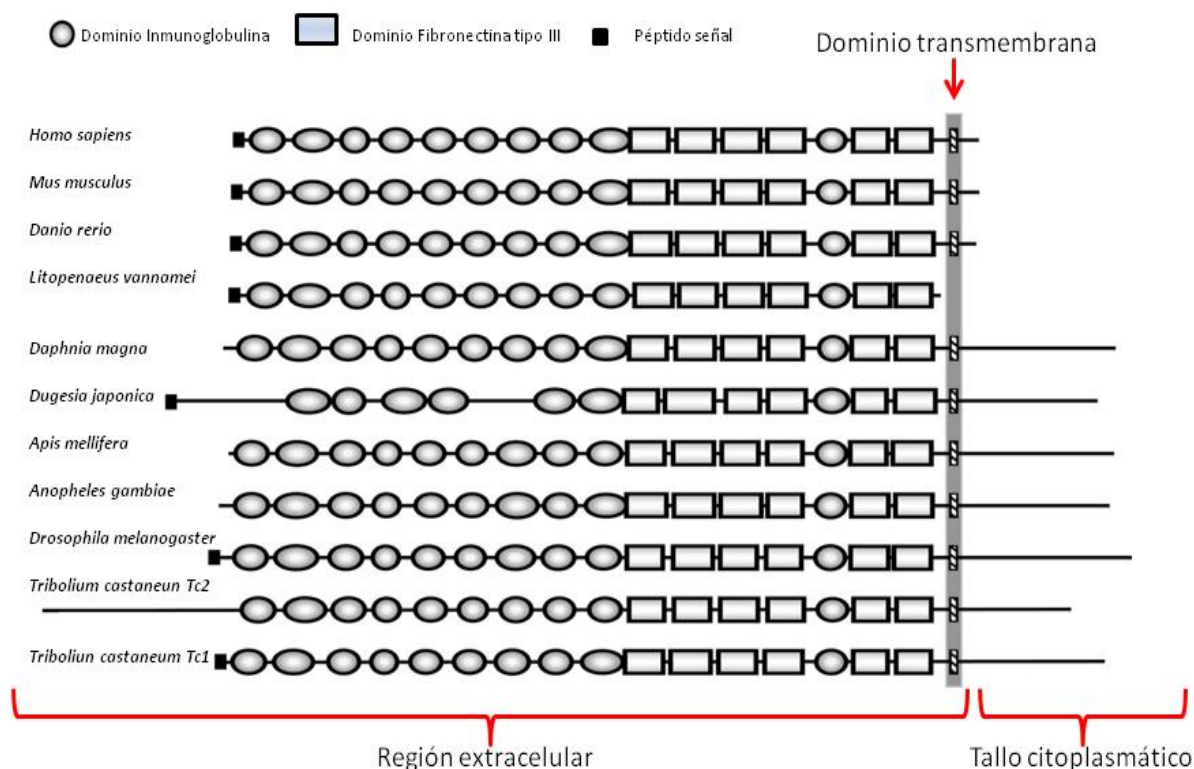


Figura 2. Comparación de los dominios de Dscam en diferentes grupos taxonómicos. De arriba hacia abajo *Homo sapiens* Hs:AAF27525, *Mus musculus* Mm:NP_112451, *Danio rerio* Dr:NP_001025395, *Daphnia magna* Dma:ACC65887, *Dugesia japonica* Dj:BAE94189, *Apis mellifera* Am:NP_001014991, *Anopheles gambiae* Ag:EAA05472, *Drosophila melanogaster* Dm:AAF71926, *Tribolium castaneum* Tc2:XP_967655, *Tribolium castaneum* Tc1:NP_00110784. Modificado de Chou *et al.* (2009).

La alta diversidad molecular observada en la región extracelular de Dscam no ha sido observada en organismos vertebrados (Armitage *et al.*, 2012; Schmucher *et al.*, 2000).

Por ejemplo, en *Drosophila* los exones 4, 6, 9 y 17 producen 12, 48, 33 y 2 variantes exónicas respectivamente y permiten la generación de numerosas isoformas únicas, si se multiplican todas las posibles variantes ($12 \times 48 \times 33 \times 2$) se obtienen 38016 posibles isoformas, este número puede incrementar hasta 152,064 debido a la ausencia/presencia de exones 19 y 23. El número de isoformas que puede presentar Dscam difiere de una especie a otra (Armitage *et al.*, 2012; Schmucher *et al.*, 2000).

2. ANTECEDENTES

La proteína Dscam es miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, tiene un papel fundamental en el sistema inmune alternativo de algunos invertebrados (Dimopolous 2006; Dong *et al.*, 2006; Watson *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004). Las isoformas de Dscam, codificadas por un solo gen, exhiben una gran diversidad molecular, con capacidad de participar en el reconocimiento específico, unión y eliminación de patógenos (Brites *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2013; Ng *et al.*, 2014; Watthanasurorot *et al.*, 2011).

En el análisis de Dscam en *Drosophila*, se identificó que mediante el proceso de splicing alternativo mutuamente excluyente en dominios variables, Dscam podría generar hasta 18,000 isoformas con dominios extracelulares diferentes. La expresión de Dscam se identificó en células del tejido graso y hemocitos, estas células tienen un papel fundamental en la respuesta inmune de tipo humoral y celular, respectivamente. Se reportó que hemocitos mutantes carentes de Dscam redujeron su capacidad de fagocitar bacterias de *E. coli* lo que sugiere su participación en la unión a bacterias (Watson *et al.*, 2005).

El análisis de las secuencias identificadas en *Drosophila*, *Tribolium castaneum* y *Bombyx mori*, mostró la alta conservación estructural de los dominios de Dscam, evidenciando una sorpresiva complejidad molecular del sistema inmune de insectos (Watson *et al.*, 2005).

Se han identificado genes homólogos de Dscam en organismos invertebrados como *L. vannamei*, *Penaeus monodon*, *Daphnia pulex*, *magna*, *Pacifastacus leniusculus*, *Eriocheir sinensis*, *Scylla paramamosian* y *Sacrostrea glomerata* (Brites *et al.*, 2008; Chou *et al.*, 2009, 2011; Ert *et al.*, 2016; Li, Whensi *et al.*, 2017; Watthanasurorot *et al.*, 2011; Xing-Kun *et al.*, 2013).

En *L. vannamei* se identificó una región codificante para Dscam de 4761 pb. La estructura de la región codificante está compuesta por: nueve dominios de Inmunoglobulina (Ig1-Ig9), cuatro dominios de FNIII y un dominio (Ig10) y dos dominios FNIII, el dominio TM y el tallo citoplasmático no están presentes. El motivo Arg-Gly-Asp (RGD) involucrado en anclado celular, ubicado entre los dominios Ig6 e Ig7, en los aminoácidos 595-597 (Chou *et al.*, 2009). La expresión de Dscam realizada por retrotranscripción (RT-PCR) mostró que los transcritos se expresan abundantemente en órgano linfóide y corazón, seguido por hemocitos e intestino, baja expresión en nervio, músculo y branquias, y sin expresión detectable en estómago, pleópodos y hepatopáncreas. (Chou *et al.*, 2009). La clonación y caracterización de 62 ADNc (ADN complementario) de hemocitos colectados de camarones en la etapa persistente y aguda de infección con virus del síndrome de mancha blanca (WSSV) y en condiciones control, permitió la identificación de veintitrés secuencias de aminoácidos con variaciones en el extremo N-terminal del dominio IgG 2, treinta secuencias con variaciones en el N-terminal del dominio Ig3 y trece en el dominio Ig7. Estas evidencias, sugieren que los dominios Ig2 e Ig3 son funcionalmente más importantes que Ig7 en la respuesta frente a WSSV en *L. vannamei* (Chou *et al.*, 2009).

Los reportes de Chou *et al.* (2011), mencionan la existencia de dos formas de Dscam, la unida y la no unida a membrana en el camarón *P. monodon*. La secuencia parcial de Dscam en *P. monodon* consta de 4713 pb, que codifica para una secuencia de 1571 residuos de aminoácidos. La estructura de la proteína coincide con lo reportado para Dscam de *L. vannamei*, diez dominios de Ig, seis dominios de FNIII. El motivo RGD también se identificó entre el dominio conservado Ig6 e Ig7, que corresponde a los residuos 595-597. Para identificar la expresión de Dscam en diferentes tejidos, los autores amplificaron sólo la región conservada Ig6-Ig9 de Dscam. Los resultados mostraron que corazón, nervio y tejido linfóide expresan abundantemente Dscam, branquias, hemocitos, músculo e intestino medio mostraron baja expresión, indetectable en pleópodos, estómago y hepatopáncreas (Chou *et al.*, 2011). Además, identificaron secuencias alternativas de

Dscam, para ello aislaron y secuenciaron de 20 a 21 clonas aleatoriamente de cada grupo evaluado: control, inoculados con WSSV e inoculados con PBS. En total se identificaron veintiocho variantes localizadas en el N-terminal del dominio Ig2, cuarenta y tres en el N-terminal del dominio Ig3 y diecinueve en el dominio Ig7. Considerando que las secuencias alternativas pueden seleccionarse de manera independiente un estimado de 22, 876 isoformas podrían originarse (Chou *et al.*, 2011).

Trabajos realizados por Hung *et al.* (2013), en Dscam de *L. vannamei*, mostraron que dos elementos localizados en el dominio del tallo citoplasmático, se expresan diferencialmente en los distintos tejidos. El elemento 1 variante A (1A, incluye dominio transmembrana y motivo endocitosis) se expresa predominantemente en tejidos inmuno-relacionados, hemocitos y órgano linfoide. El elemento 1 variante B (contiene solo dominio TM) se expresa predominantemente en branquias, corazón, intestino medio y tejido nervioso. La combinación de estos elementos se expresa en los diferentes tejidos evaluados, de manera particular en hemocitos, solo se identificó la expresión del elemento 1A. Además, identificaron dos isoformas de Dscam de *L. vannamei* inducidas por la presencia a *V. harveyi* (V2 y V5) y dos en condiciones normales (N1 y N2) se utilizaron para evaluar la capacidad de unión de Dscam. Las cuatro isoformas (V2, V5, N1 y N2) mostraron una fuerte unión a *V. harveyi*. La capacidad de unión a *E. coli* fue relativamente baja pero N2 y V2 mostraron mayor habilidad de unión en comparación con N1, V5 y la proteína control (EGFP). Los autores mencionan la existencia de una “super isoforma” o “isoforma general” capaz de unirse a *V. harveyi*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y WSSV. El análisis de los resultados sugiere que Dscam no es un factor inmune de acción inmediata en presencia de ciertos patógenos (Hung *et al.*, 2013).

En el cangrejo del Pacífico *Pacifastacus leniusculus*, se identificó una expresión abundante de Dscam en corazón, una expresión moderada en cerebro, nervio, tejido hematopoyético y testículos, baja expresión en estómago, branquias, músculo y hemocitos y no se detectó en hepatopáncreas e intestino. Se identificó una secuencia de 6,009 pb que codifica para

una secuencia de 2,002 aminoácidos, la organización de los dominios permanece conservada nueve dominios (Ig), cuatro dominios FNIII, dos dominios de inmunoglobulina (Ig), dos dominios FNIII y un tallo citoplasmático, también se identificó el motivo RGD. Se estimó que Dscam puede dar origen a más de 22,000 isoformas únicas (Watthannasurorot *et al.*, 2011).

La exposición de *P. leniusculus* a LPS, *E. coli* y *S. aureus* indujo un incremento en la expresión de Dscam a las 6 h y 24 h posteriores al reto. La inoculación con WSSV y peptidoglicano no tuvo efecto en los niveles de expresión de Dscam. La identificación de una isoforma inducida posterior a la inoculación con *E. coli* (E), *S. aureus* (S) y el grupo control (N), fueron utilizadas en los ensayos de unión de Dscam. La isoforma E se une con facilidad a *E. coli*, con una alta capacidad de unión en comparación a las isoformas N y S. De igual manera la isoforma S se une fuertemente a *S. aureus*, las isoformas E y N no mostraron la misma afinidad (Watthannasurorot *et al.*, 2011).

Por otra parte, en *E. sinensis* se reportó la expresión de Dscam en hepatopáncreas, branquias, hemocitos, cerebro, intestino y estómago. Observaron que los niveles de expresión de Dscam aumentaban después de la exposición a componentes de membrana bacteriana como lipopolisacáridos, peptidoglucanos y β -1,3-glucanos. También evidenciaron la forma de Dscam unida a hemocitos y una forma circulante, esta última aumentó su expresión posterior a la exposición a los componentes mencionados anteriormente (Xing-Kun *et al.*, 2013).

En *Scylla paramamosian* recientemente se reportó la presencia de Dscam, altamente expresada en cerebro, piel, músculo, intestino y hepatopáncreas, sin embargo, se expresa débilmente en hemolinfa, corazón y branquias. Identificaron una secuencia de 7363 pb, con un ORF de 6069 pb que codifica para una secuencia de 2,022 aminoácidos. La expresión de Dscam fue inducida posterior a la inoculación con *V. parahaemolyticus*.

Además reportan que Dscam tiene alta capacidad de unión y eliminación de *V. parahaemolyticus* (Li *et al.*, 2017).

En moluscos bivalvos existe poca información de Dscam, se han identificado transcritos de Dscam en *Saccostrea glomerata* (Ertl *et al.*, 2016), *Mytilus edulis* (Gorbushin e Iakovleva, 2013) y en ganglio visceral de *C. gigas* (Gorbushin e Iakovleva, 2013). Se ha sugerido que la expresión podría ser tejido específica y que no existen isoformas de Dscam en hemocitos de *C. gigas*, sin embargo, existe muy poca información acerca de las condiciones experimentales en *M. edulis* y *C. gigas* (Gorbushin e Iakovleva, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los cultivos de mayor producción acuícola y de gran impacto en el Noroeste del país, es el de ostiones del género *Crassostrea* spp. El cultivo de las especies *C. gigas* y *C. corteziensis* contribuyen al desarrollo social y económico de las comunidades que se dedican a su producción, sin embargo, la presencia de microorganismos patógenos comprometen la obtención de un producto de calidad para el consumo humano, además de provocar pérdidas económicas importantes.

Debido a la importancia económica, gastronómica y a la poca información acerca de la interacción específica frente a patógenos en ostreidos, surge la necesidad de buscar moléculas blanco que aporten conocimientos de dicho mecanismo.

Como se ha observado en algunos organismos invertebrados, *L. vannamei*, *E. sinensis* y *P. leniusculus*, *S. paramamosian*, Dscam puede aportar información acerca de dicha interacción. Un mejor entendimiento de estas nuevas moléculas con amplia capacidad de diversificación podría contribuir a la prevención, tratamiento y diagnóstico de patógenos.

4. HIPÓTESIS

Dadas las características de función y variabilidad que despliega Dscam en algunos invertebrados, se hipotetiza que en *Crassostrea* spp., Dscam participa en el reconocimiento de patógenos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Demostrar la presencia de Dscam en *C. gigas* y *C. corteziensis* así como su participación en la respuesta frente a patógenos.

5.2 Objetivos específicos

1. Identificación y caracterización del transcrito de Dscam en diferentes tejidos provenientes de *C. gigas* y *C. corteziensis*.
2. Localización tisular y celular de Dscam en *C. gigas* y *C. corteziensis*.
3. Evaluar la expresión de Dscam de *C. gigas* durante el proceso de exposición a *E. coli*.
4. Construcción de una biblioteca genómica natural de fagos a partir de las regiones variables del gen Dscam de *C. gigas*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Análisis *in silico*

A partir de las secuencias del transcrito de Dscam de invertebrados disponibles en la base de datos GenBank y el uso de las plataformas Pfam <http://pfam.xfam.org> y SMART <http://smart.embl-heidelberg.de>, se identificaron las regiones de ADN codificantes para los dominios de Dscam, a partir de las cuales se hizo el diseño de oligonucleótidos específicos. El diseño de oligonucleótidos específicos se realizó con el programa Primer 3 Plus <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>.

6.2 Estudios experimentales

6.2.1 Características y procedencia de los individuos de estudio

Las especies incluidas en este proyecto fueron *C. gigas* y *C. corteziensis*, de talla adulta (aproximadamente 90 ± 5 mm). Los residuos orgánicos observados en el exterior de la concha, algas y briozooarios, entre otros, se eliminaron mediante cepillado y enjuague externo. Los individuos de la especie *C. gigas* fueron obtenidos de cultivos acuícolas de la granja Mar Mex, CIBNOR, La Paz, B.C.S., y granjas locales de Baja California. Estos individuos se utilizaron para la construcción de la biblioteca genómica de Dscam. Además, se colectaron muestras de individuos de *C. gigas* infectados con OsHV-1 en granjas acuícolas del estado de Sonora, dichas muestras fueron donadas amablemente por el Dr. Llera (CIAD, Mazatlán, Sinaloa). Los individuos de la especie *C. corteziensis* fueron colectados en la Boca de Camichin en Nayarit bajo sospecha de infección por *P. marinus*. En este estudio se incluyeron individuos cuya procedencia no fue proporcionada por el proveedor y bajo sospecha de infección por *E. coli*, *Vibrio* sp. entre otros. Estos individuos

fueron recibidos por el laboratorio de Histología del CIBNOR, La Paz, B.C.S. e incluidos en la construcción de la biblioteca genómica (Anexo A).

6.2.2 Purificación de ADN y detección de patógenos

Para el aislamiento de ADN total se utilizaron las branquias de ambas especies bajo sospecha de presencia de patógenos. El tejido se colocó en solución de lisis (5M NaCl, 1M Tris, 0.5M EDTA y 10% SDS pH 8.) con 20 µg/mL de proteinasa K (Thermo Fisher Scientific) e incubó toda la noche a 37°C. Posteriormente, se agregó NaCl 6M y se agitó vigorosamente. El ADN fue precipitado con etanol al 70% y centrifugado a 1200 × *g* durante 10 min; el botón de ADN fue resuspendido en agua grado molecular.

El ADN obtenido se utilizó para la detección de patógenos. Mediante ensayos de PCR punto final se amplificaron los genes ya establecidos en el diagnóstico de OsHV-1 y *P. marinus*. Para las muestras de *C. gigas* se utilizaron los oligonucleótidos específicos forward (DPF) y reverse (DPR) que amplifican la subunidad catalítica de ADN polimerasa de OsHV-1 (Webb *et al.*, 2007). En el caso de *C. corteziensis* se utilizaron los oligonucleótidos específicos forward (Perkits-85), y reverse (Perkits-585) que amplifican una región del ITS (Internal Transcribed spacer) del operon ribosomal de *P. marinus* (Casas-Villalba y Reece, 2002).

6.2.3 Extracción de ARN

Para la obtención de ARN total se diseccionaron fragmentos de branquia y manto, los cuales fueron colocados en tubos de 1.5 mL que contenían 1 mL de RNA later (Life Technologies). Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento, otra porción de tejido sin RNA later se almacenó a -80°C.

Antes de iniciar el procedimiento de extracción de ARN se limpiaron las superficies e instrumentos de trabajo con alcohol al 70% y enseguida se agregó RNase Zap (Life Technologies) para minimizar la presencia de enzimas degradadoras del RNA (RNAsas).

Se pesaron 50 mg de tejido y se colocaron en tubos de 1.5 mL con 1 mL de TRIzol (Life Technologies). Los tejidos se homogenizaron utilizando pistilos estériles o mediante FastPrep con el uso de perlas de silicato de zirconio y cerámica. Se aplicaron 2 ciclos de 30 seg con una aceleración de 4.5 m/s.

Se agregaron 200 μ L de cloroformo (SIGMA), se mezcló suavemente por inversión, permanecieron en reposo durante 3 min a temperatura ambiente, enseguida se centrifugaron a 4°C a 12, 000 $\times g$ durante 15 min. La fase acuosa se colocó en tubo nuevo y se agregaron 500 μ L de isopropanol, se mezclaron por inversión, permanecieron en reposo 10 min a temperatura ambiente, nuevamente se realizó un paso de centrifugación a las mismas condiciones anteriores de velocidad y temperatura por 10 min, se decantó la fase acuosa con sumo cuidado para no eliminar el botón de ARN. Se realizaron lavados con 1 mL de etanol al 75%, se centrifugaron en las mismas condiciones durante 5 min, se descartó el sobrenadante, los botones se secaron a temperatura ambiente por aproximadamente 10 min, posteriormente se hidrataron con 50 μ L de agua grado biología molecular (Life Technologies) e incubaron por 10 minutos a 55°C. Se determinó la integridad del ARN total mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con Red gel (Biotium) y su concentración y pureza se determinó utilizando un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

6.2.4 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para eliminar restos de ADN se realizó un tratamiento enzimático con DNase Kit de la marca SIGMA en cada una de las muestras de ARN total siguiendo las indicaciones del fabricante. Enseguida se realizó el procedimiento de RT-PCR utilizando el kit comercial

ImProm-II Reverse Transcription System Kit (Promega). El ADNc fue conservado a -20°C para posteriores ensayos.

6.2.5 Amplificación de Dscam

Se diseñaron varios pares de oligonucleótidos específicos para lograr la amplificación de los diferentes dominios de Dscam de ambas especies (Tabla I y II). Cada mezcla de reacción contenía 0.25 U de Go Taq Flexi DNA Pol (Promega), dNTPs 0.25 mM, MgCl₂ 2.5 mM, 0.1 μM de cada primer, 1 μL ADNc 50ng/μL, buffer de PCR (50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM NaCl) en un volumen final de reacción de 25 μL. Las condiciones de PCR punto final fueron las siguientes: 95°C por 2 min, seguidos de 30 ciclos de 95°C por 1.5 min, 62°C por 0.5 min y 72°C por 1 min. Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis, en geles de agarosa al 1.2 %, teñidos con Red Gel y visualizados en un fotodocumentador con luz UV (Sistema BioDoc-It, UVP). Los productos amplificados se enviaron a la empresa MacroGen para su secuenciación.

6.2.6 Hibridación *in situ* (H. *in situ*)

Para los ensayos de hibridación *in situ* se utilizaron en total 33 cortes de organismos de talla adulta de *C. gigas* y *C. corteziensis*, previamente fijados en bloques de parafina conservados a 4°C, de los cuales cuatro fueron de organismos controles (sin evidencia de patógenos) para cada especie y el resto de organismos infectados con OsHV-1 para *C. gigas* y *P. marinus* en *C. corteziensis*. También se analizaron organismos como control de los ensayos de hibridación (sin sonda marcada) para descartar la presencia de señal inespecífica.

6.2.7 Síntesis de sondas

Se obtuvo ADNc de branquia y manto de individuos sanos de *C. gigas* y *C. corteziensis*, respectivamente, utilizando el procedimiento descrito anteriormente. Para la amplificación de la región conservada de Dscam, se mantuvieron las concentraciones de reacción descritas, se emplearon los siguientes oligonucleótidos denominados sonda A forward 5'CCGATATTGCCAAGACGAAT'3 y reverse 5'CCTCAACACGAACAGCTTTAAC'3 y sonda G forward 5'-ACATGAGGCGTAGAAGGGAG'-3, reverse 5-AGGTCTGGGGATTTGTCTCG-3'. Las condiciones de PCR punto final fueron las siguientes: 95°C por 2 min, seguidos de 30 ciclos de 95°C 2 min, 60°C por 0.5 min y 72°C por 1 min. El producto de ADN obtenido se analizó en geles de agarosa al 1.2 %, teñido por Gel Red y visualizados en fotodocumentador mediante luz UV.

6.2.8 Marcaje de sondas

Para cada ensayo de hibridación *in situ* se prepararon dos alícuotas de 1 µg de sonda A (sonda G solo para ensayo de estandarización) de cada especie. Para la incorporación de UTP marcado con Digoxigenina, se utilizó DIG DNA labeling and Detection Kit (Roche) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, cada mezcla de reacción contenía: 1 µL de enzima Klenow (2U/µL), 2 µL mezcla de hexanucleótidos 10X y 2 µL mezcla de dinucleótidos marcados (0.35-1 mM) en un volumen final de 20 µL por reacción. Cada tubo de reacción se incubó por un período de 20 horas a 37°C, la reacción se detuvo con 2 µL de EDTA 0.2 M pH 8.0.

6.2.9 Preparación de las laminillas e H. *in situ*

Las laminillas con los cortes de tejidos fueron desparafinados en tres soluciones de xilol a diferentes concentraciones con períodos de incubación de 10 min, inmersiones en alcohol

con diferentes grados de pureza, desde 100% hasta 50%, con incubaciones de 5 min cada uno y solución amortiguadora PBS 1X por 5 min. Para eliminar la presencia de proteínas se agregaron 15 μ L proteinasa K (10 μ g/mL) en cada una de las laminillas y se incubaron a 37°C por 15 min.

Una vez desparafinados los cortes de tejido fijados en laminillas, se colocaron 10 μ L de sonda A o G, previamente desnaturalizadas por inmersión en agua a 100°C, durante 10 min, se cubrieron las laminillas con papel parafilm y colocaron en un horno de hibridación a 42°C toda la noche. Una vez concluido el período de incubación se realizaron varios lavados con soluciones de citrato de sodio 2X (SSC) 0.1% SDS, se colocó una solución bloqueadora, seguido la incorporación del anticuerpo Anti-DIGoxigenina-AP (1 μ L de Anti-Dig más 999 μ L de solución bloqueadora), después se agregaron 100 μ L de solución de detección (Tris-HCl 0.1M, NaCl 0.1M pH 9.5), 200 μ L de solución de sustrato o revelado (40 μ L NBT/BCIP en 2 mL de solución de detección) en condición de oscuridad y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se eliminó el exceso de solución, cada laminilla fue teñida con el colorante café de Bismark (SIGMA), dejándose secar a temperatura ambiente, se agregaron dos gotas de poli resina, se cubrió con un cubreobjetos eliminándose el exceso y se almacenaron a temperatura ambiente para su análisis.

6.2.10 Evaluación de la expresión de Dscam por PCR cuantitativa

Los ensayos de PCR cuantitativa (qPCR) se realizaron en el equipo CFX96 (BioRad). Cada reacción se hizo por triplicado, en un volumen de reacción final de 10 μ L, que contenía 5 μ L de Sso fast EvaGreen Mix (BioRad), 1 μ L oligonucleótidos forward y reverse con una concentración de 0.3 mM, ADNc (25 ng/ μ L) y agua ultra pura PISA. Las condiciones de amplificación fueron 95°C (0.5 min) 95°C (0.1 min) seguido por 64°C (0.5 min) por 39 ciclos con un incremento de 0.5°C en el rango de 65°C -95°C.

Para calcular la eficiencia de cada gen a utilizar se realizaron diferentes curvas estándar. El cálculo de la eficiencia de un gen se obtiene de: $Eff=10^{\text{slope}}$, los datos obtenidos en la fase exponencial, fueron linearizados y se eligió aquella donde, E es igual o cercano a 2.

Los análisis de expresión fueron calculados con el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Este método permite presentar las veces de cambio en la expresión del gen de interés normalizados respecto al gen de referencia y condición control (calibrador). Los datos de cada muestra se obtuvieron por triplicado, en todas las condiciones evaluadas. Los valores de Cq fueron analizados con el método siguiente:

1) Normalización de los Ct del gen a evaluar respecto al gen de referencia

$$\Delta Ct C = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ referencia} \quad (1)$$

$$\Delta Ct E = Ct \text{ gen de interés} - Ct \text{ referencia} \quad (2)$$

donde: $\Delta Ct C$, representa los datos de Ct obtenidos en condición control (sin infección) y $\Delta Ct E$, es la condición experimental a evaluar en este caso infección con patógenos, para los genes de interés (Dscam, IL17-3, TLR2 y FREP) y los genes de referencia (GAPDH, RPL13 y RPL9).

2) Normalización del ΔCt del gen de interés respecto a la condición control (calibrador)

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct E (\text{infección}) - \Delta Ct C (\text{promedio control}) \quad (3)$$

3) Cálculo de la expresión del gen de interés respecto a la condición control

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{Expresión normalizada del gen de interés} \quad (4)$$

Para el análisis de estabilidad de los candidatos como genes de referencia se utilizó <http://leonxie.esy.es/RefFinder/> basado en los métodos Delta CT, GeNorm, NormFinder y BestKeeper.

Los genes de referencia analizados fueron proteína ribosomal L-13 (RPL13) (Li *et al.*, 2014), gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de elongación 1-alfa (EF-1), proteína ribosomal L-9 (RPL9) y tubulina alfa (Tub-a) (Tabla I). Sin embargo, solo se eligieron los de mayor estabilidad.

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para amplificar genes de referencia y regiones conservadas y variables del transcrito de Dscam.

Secuencia	Nombre del primer	Referencia/Uso
Forward: CCGATATTGCCAAGACGAAT Reverse: CCTCAACACGAACAGCTTTAAC	Sonda A	<i>H. in situ</i>
Forward: ACATGAGGCGTAGAAGGGAG Reverse: AGGTCTGGGATTGTCTCG	Sonda G	<i>H. in situ</i>
Forward: GTCCAAGGATGGTCTGAAT Reverse: TTGCTGACGATGTTCTGGTC	GAPDH	qPCR
Forward: TTCCGTCACCTGGCTGTAGA Reverse: TGGGGAAATGGGCATACACT	RPL9	qPCR
Forward: GGCATTATTAGGGAGACTGGCTTCA Reverse: TCAGGTATTTACAGACCTTCAGTTTGT	RPL13	qPCR/Li <i>et al.</i> , 2014
Reverse: GCACCGCCTTATTGGTGATT Forward: ACTGCAGCCTTTTCCTTCCA	TLR2	qPCR/Zhang Yang <i>et al.</i> , 2013
Reverse: CGGATAACTCGGCAATGGGTAGACT Forward: CCGTCTTGTATTCCGTCAGTTCC	FREP	qPCR/Zhang Yang <i>et al.</i> , 2013
Forward: TCACTACCAACTGAACTACGACCG Reverse: TGCGACAGAGCCTGAGAACC	IL-17	qPCR/Li <i>et al.</i> , 2014
Forward: GGTGGATTCTGCACGATGTT Reverse: TGGTGTGGCGAAGTCTAGA	Aconq	qPCR
Forward: CGGAATCGCCGTTTGACATC Reverse: CCAGCAGTAGTGGTCACGTT	Dominio 1 - 5	Biblioteca
Forward: CGGCGATTTTCAACTGTACG Reverse: TGGTCCCACGTTGTTTCATTG	Dominio 4 – 8	Biblioteca
Forward: CTGCACGATGTTAAGGCTGC Reverse: GGCAGACACCTCAAATCGGA	Dominio 1- 9 (Cg1)	Biblioteca
Reverse: GTGAATGTCCACCTCTGGCA	Dominio 1- 9 (Cg2)	Biblioteca

6.2.11 Evaluación de la expresión de Dscam durante la exposición a *E. coli*

Para determinar la expresión de Dscam y otros genes de respuesta inmune durante la exposición a *E. coli* se realizó un bioensayo en las instalaciones especiales de la Unidad Pichilingue de la UABCS. En un laboratorio aislado y de uso restringido, 30 organismos de talla adulta de aproximadamente 70 mm fueron inoculados con 1×10^6 UFC/mL de *E. coli*, 30 organismos más fueron inoculados con solución salina estéril. Se colectaron cinco individuos a las 0, 4, 6, 12, 24 y 48 h en ambos grupos, inoculados y control.

Se diseccionaron fragmentos de tejido de manto y branquia y se colocaron en 1 mL de RNA later y almacenaron a -20°C . Las reacciones de qPCR se realizaron de manera individual en todas las condiciones evaluadas, la preparación de las mezclas de reacción se prepararon con el uso del robot epMotion 5075 (Eppendorf).

6.2.12 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa PRISM (Ver. 7.02), se realizaron análisis de estadística paramétrica, para comparar los datos de grupo control contra grupo infectado. Todos los datos son presentados como medias geométricas \pm SE. Las diferencias en la expresión relativa de cada gen fueron determinadas por la prueba t de student y ANOVA. La significancia estadística se consideró cuando $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación y caracterización del transcrito de Dscam en diferentes tejidos provenientes de *C. gigas* y *C. corteziensis*.

Diseño de oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los dominios de Dscam

Inicialmente se realizó la búsqueda de secuencias del transcrito de Dscam disponibles en el GenBank. A partir de la secuencia del transcrito de Dscam de ganglio visceral de *C. gigas* (Número de acceso JQ433974.1), se identificaron los dominios y las secuencias utilizando las bases de datos Pfam <http://pfam.sanger.ac.uk/>, Conserve Domains Database CDD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml> y Simple Modular Architecture Research Tool SMART <http://smart.embl-heidelberg.de/>.

Se organizaron las secuencias de nucleótidos correspondientes a cada secuencia de aminoácidos de los distintos dominios de Dscam. Debido a nuestro interés en la amplificación por conjunto de dominios, se diseñaron varios pares de oligonucleótidos utilizando el software Primer3 web <http://primer3.ut.ee/>. Se diseñaron doce pares de oligonucleótidos para amplificar, mediante PCR, desde el péptido señal hasta 200 pares de bases río abajo del tallo citoplasmático del transcrito de Dscam. En la Tabla II se muestra la secuencia de los pares de oligonucleótidos, tamaño esperado (del amplicón) y denominación.

Todos los pares de oligonucleótidos diseñados amplificaron específicamente y los amplicones fueron del tamaño esperado. Los ensayos y resultados que se muestran a continuación se obtuvieron con el uso de los primeros siete pares de oligonucleótidos.

Individuos utilizados

Las muestras analizadas incluyeron branquias y manto de individuos control e infectados. De manera particular, los individuos de *C. gigas* estaban infectados con OsHV-1, mientras que los de *C. corteziensis* con *P. marinus*. La confirmación de infección por ambos patógenos se realizó como está descrito en el apartado de materiales y métodos.

Tabla II. Diseño de oligonucleótidos para la amplificación por PCR de Dscam en *Crassostrea* spp. Se indican los dominios que incluye, el tamaño y el nombre utilizado durante el desarrollo experimental.

Secuencia	Dominios Dscam	Tamaño esperado (pb)	Nombre
Forward: CCGATATTGCCAAGACGAAT Reverse: CCTCAACACGAACAGCTTTAAC	Pep señal - Ig 1	520	A
Forward: CAAGGCCGCTTATTTACACG Reverse: CGGTTGCAATACAACGGATT	Ig2 - Ig3	580	B
Forward: TCAAGAATGAGACCAGCAG Reverse: GGGAGAACCTGTGGTGAGAC	Ig4- Ig5 - Ig6	885	C
Forward: CCGTACCACCAACTACACA Reverse: CGGACCCTATAGCCTTGACA	Ig7- Ig8 – Ig9	870	D
Forward: GGATATGGTAAAGCCAGTGGAA Reverse: GCCATGGTATCAACATAACAGC	FN1 – FN2- FN3	950	E
Forward: AAGGGGAGAGAACCCACAGT Reverse: CCTCCTCTTTGTGATGAACAG	FN4 – Ig10 - FN5	880	F
Forward: AAGTTTGCCACCCTCACCTA Reverse: CCACTGGAGAGATTATGCTCTGTCT	FN6- Tallo citop-200	800	G
Forward: AGGGCTCTCTGGTCAAAAGG Reverse: TGGAGTTCACCGTCAGACAA	Pep señal – Ig2	808	SD1
Forward: CCGCCGTCTTCAAGTGTATC Reverse: CGTACAGTTGAAAATCGCCG	Ig2- Ig3 – Ig4- Ig5	596	SD2
Forward: CGGCGATTTTCAACTGTACG Reverse: AATTCTTGGCAGTGCAGGTG	Ig4- Ig5	702	SD3
Forward: TCCCAAGAACCACCTCCAAA Reverse: TGGTCCCACGTTGTTTCATTG	Ig5 - Ig6 – Ig7- Ig8	690	SD4
Forward: CAATGAACAACGTGGGACCA Reverse: TGATGAGACTTCCACTGGCT	Ig8 - Ig9 - Ig10	612	SD5

Extracciones de ARN total

Se obtuvo ARN total de cada uno de los individuos colectados durante el estudio. En la figura 3, se presenta el análisis electroforético del ARN total obtenido de branquias y manto de *C. corteziensis* y de branquias, glándula digestiva y manto de *C. gigas*. Se observa la relación 1:2 de las subunidades ribosomales 28s, 18s, descritas como un proceso de segregación en moluscos bivalvos, (Barcia *et al.*, 1997).

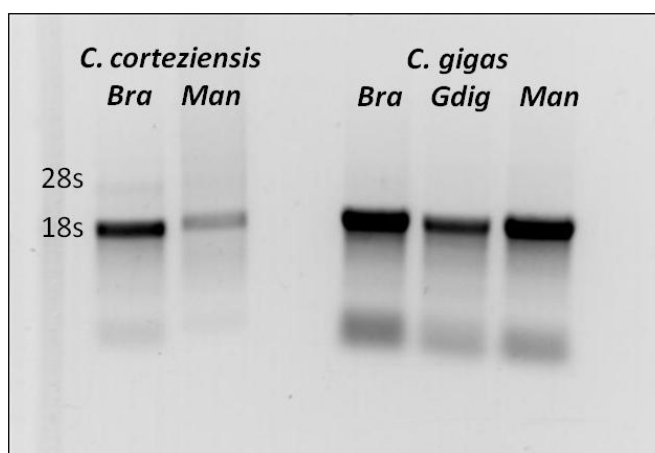


Figura 3. Análisis electroforético del ARN total obtenido de branquias (Bra) y manto (Man) de *C. corteziensis*, seguido por branquias, glándula digestiva (Gdig) y manto de *C. gigas*, se observa una relación 1:2 en las subunidades ribosomales 28s y 18s.

La concentración del ARN total de cada muestras se determinó mediante su lectura en un NanoDrop. Se eligieron aquellas con una concentración mayor a 100 ng/ μ L y cuyas lecturas fueron cercanas a 2.0 en la relación espectrofotométrica 260/280. El ARN total fue distribuido en cinco alícuotas que contenía 10 μ L cada una, cuatro de ellas fueron almacenadas a -80°C, la sobrante se utilizó para los ensayos posteriores.

Ensayos de amplificación de Dscam mediante PCR

Se estandarizaron las condiciones de reacción de PCR punto final para la amplificación de los distintos dominios del transcrito de Dscam en *Crassostrea* spp. Los productos de PCR obtenidos se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X, se corrió a 90 V por 40 min. Se verificó que el tamaño de cada uno de los productos visualizados correspondiera con el esperado, además de la ausencia de productos inespecíficos. Como control interno de amplificación del ADNc se utilizó el gen de β -actina (Fig. 4).

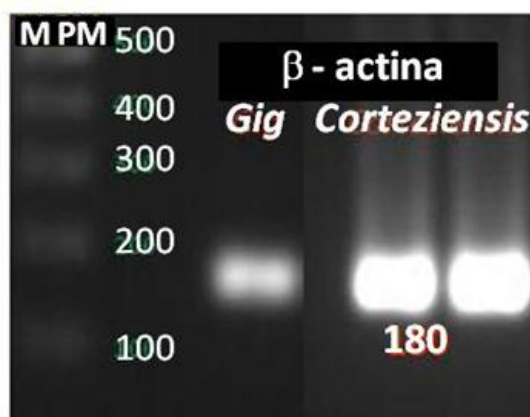


Figura 4. Amplificación por PCR del gen β -actina. Representación del análisis electroforético realizado en cada ADNc obtenido de los individuos de *C. gigas* y *C. corteziensis*. Se muestran los productos de amplificación del gen β -actina de 180 pb aproximadamente utilizado como control interno. Marcador de peso molecular (MPM).

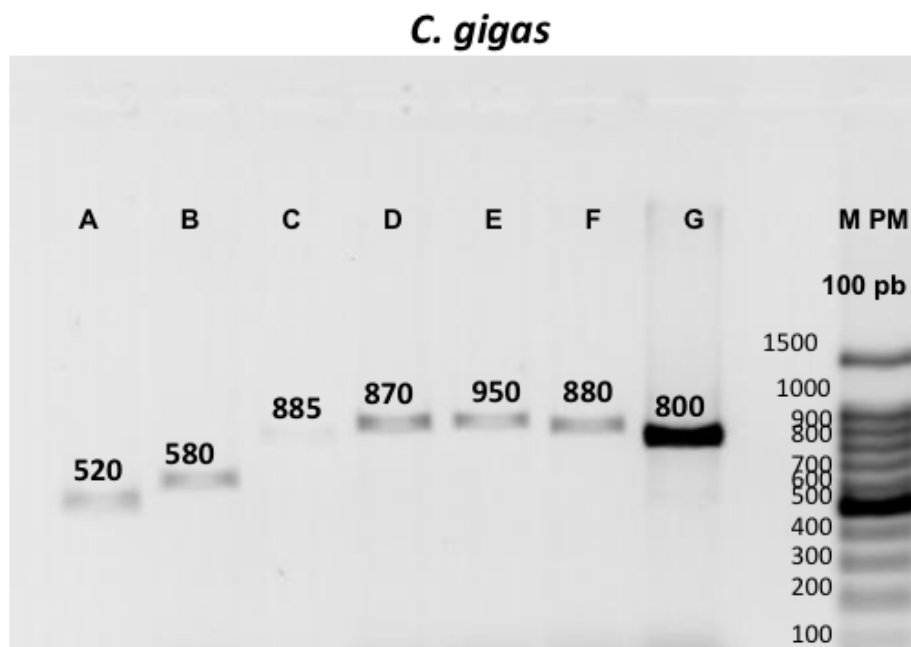


Figura 5. Amplificación por PCR de los dominios de Dscam en *Crassostrea gigas*. Análisis electroforético de los productos obtenidos, de izquierda a derecha el conjunto de dominios A, B, C, D, E, F, G, finalmente el marcador de peso molecular (100 pb).

Las bandas observadas corresponden al tamaño esperado para cada conjunto de dominios. Como se observó en la figura 5, los productos A, B, C y D muestran baja intensidad y por consiguiente una baja concentración. El protocolo fue modificado hasta obtener la concentración requerida para realizar la secuenciación (Fig. 6).

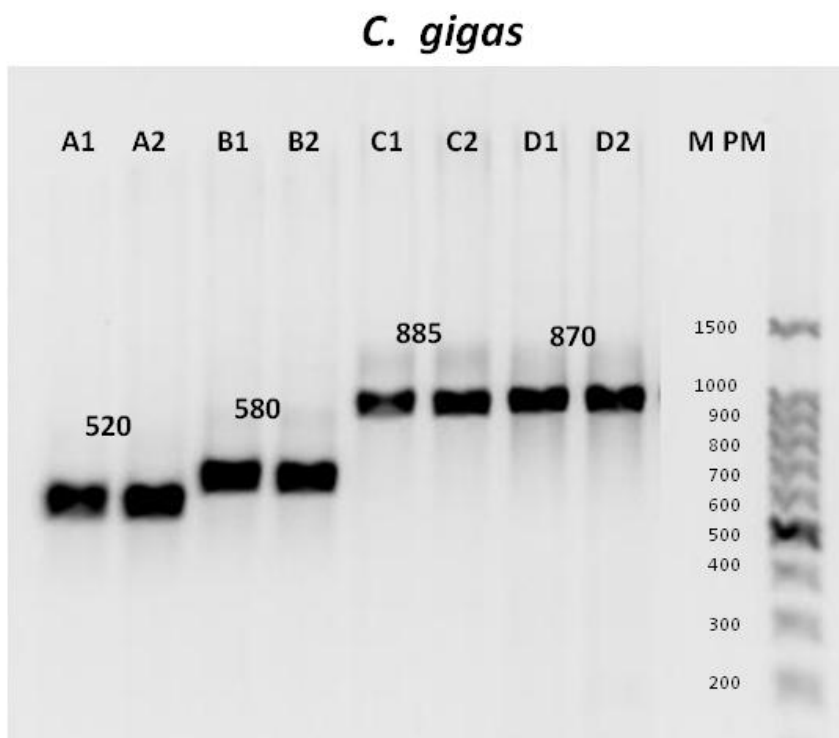


Figura 6. Amplificación por PCR de los dominios restantes de Dscam en *Crassostrea gigas*. Se muestran los productos de amplificación obtenidos. De izquierda a derecha, el conjunto de dominios A, B, C y D por duplicado, finalmente el marcador de peso molecular (MPM) de 100 pb.

En los individuos de *C. corteziensis* se logró amplificar todos los dominios de Dscam (Figs. 7 y 8). Todos los productos de PCR corresponden con el tamaño molecular esperado y sin evidencia de productos inespecíficos.

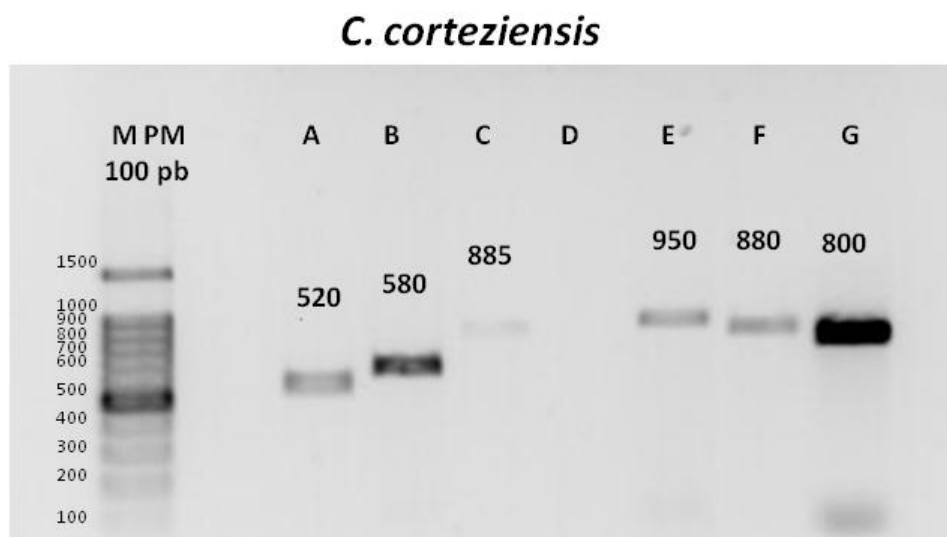


Figura 7. Amplificación por PCR de los dominios Dscam en *Crassostrea corteziensis*. Se muestran los productos de amplificación obtenidos. De izquierda a derecha, el marcador de tamaño molecular de 100 pb y el conjunto de todos dominios (excepto D).

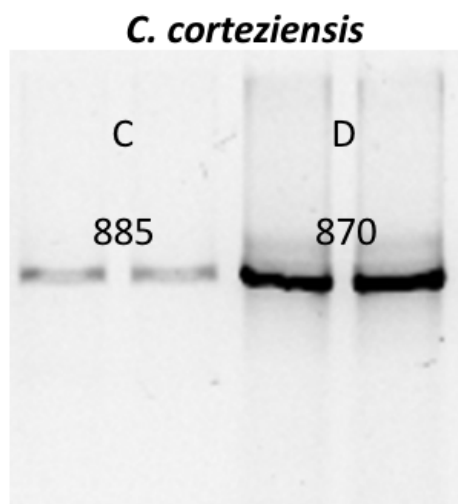


Figura 8. Amplificación por PCR de los dominios restantes de Dscam en *Crassostrea corteziensis*. De izquierda a derecha el conjunto de dominios C y D por duplicado.

Se logró amplificar los dominios de Dscam de *C. gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea* (Fig. 9) . En las especies *C. gigas* y *C. corteziensis* se analizaron los tejidos del manto, branquias y glándula digestiva, mientras que en el caso de *C. sikamea* se analizaron los individuos

completos. Todos los análisis se realizaron utilizando individuos sanos (control) e infectados. En la primera etapa de este proyecto se incluyeron los resultados obtenidos en *C. sikamea* para incrementar la búsqueda de regiones conservadas en el transcrito de Dscam.

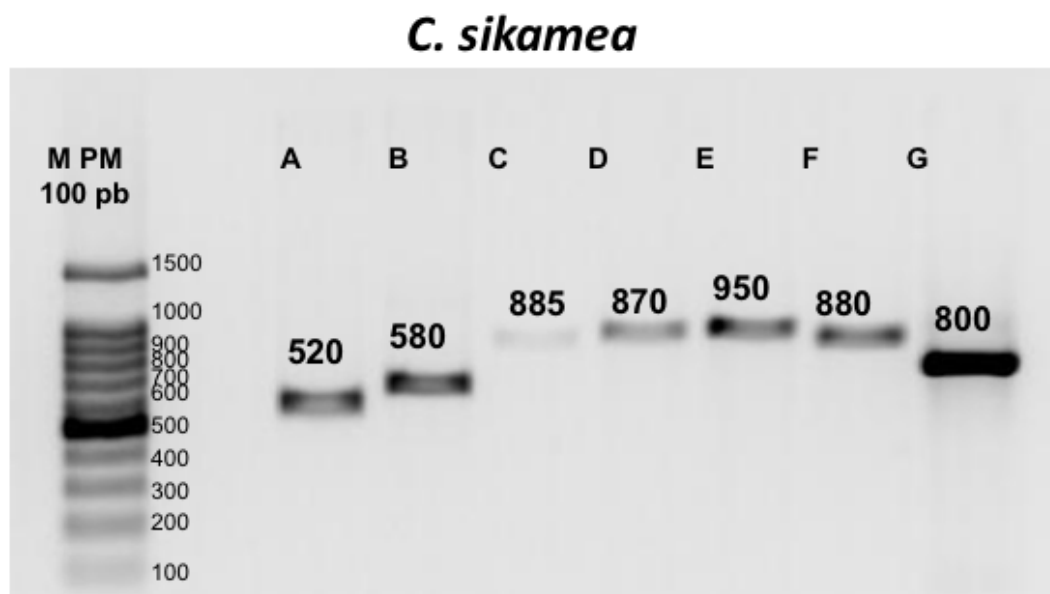


Figura 9. Amplificación por PCR de los dominios de Dscam en *Crassostrea sikamea*. Los productos obtenidos de la amplificación de Dscam de branquias de *C. gigas* y *C. corteziensis* así como de individuos completos (semillas) de *C. sikamea*, se separaron en alícuotas de 30 a 40 μ L con una concentración de 100 ng/ μ L.

El software BioEdit (versión 7.2.5, Hall, 1991) se utilizó para los procesos de edición, ensamble e identificación de secuencias consenso y regiones conservadas de Dscam en *C. gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*.

Se realizó una búsqueda de la similitud de las secuencias consenso obtenidas en GenBank utilizando la herramienta Blast <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Los resultados obtenidos muestran que las secuencias de *C. gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea* tienen un 98%, 99% y 97% de identidad, respectivamente, con la secuencia de Dscam de ganglio visceral de *C. gigas* disponible en el GenBank.

A partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas de Dscam de las tres especies utilizadas en este estudio, se buscaron regiones conservadas para el diseño de sondas y oligonucleótidos que se utilizaron en los ensayos de hibridación *in situ* y qPCR.

Se encontraron 21 secuencias conservadas de corta longitud (17-119 pb), de las cuales 10 están localizadas dentro de la región que amplifica para el péptido señal y el dominio Ig1, el resto están localizadas en el dominio TM y del tallo citoplasmático (Tablas III y IV).

Tabla III. Secuencias conservadas dentro del transcrito de Dscam de *Crassostrea* spp. localizadas en la región que amplifica para el péptido señal y el dominio Ig1.

Tamaño (pb)	Posición	Secuencia
26	65- 90	AGGAGTCAGCTTTGACTGAGGACAGT
29	105-133	TTGGAATCTGGACTGGGGTCCCAGAGCTA
118	135-252	AGTGGACCACGTTCTGTCACTTTAACCATGTGAAAGATCGG AGGCGGTGGATTCTGCACGATGTTAAGGCTGCTCCGACCTG TTTTAGTGCTGGCTTTTTTATTTGGTTCTTTAAAAG
17	264-280	GAATCGCCGTTTGACAT
23	282-304	ATCGGGGGACCTATATTTTAAAC
26	312-337	CCCTCCTCTCTAGACTTCGCCAACAC
34	339-372	AAAGGCGCCTCCGTCCAATGTACAGCTCACGGTC
45	374-418	GCCCGCTCCGACTTTGGACTGGGTAAAAGACGATGATACCCCCGT
29	442-470	AGGTTCTACCCAACAACACATTGCACTTT
78	494-571	TCCAAAGCAAAGTACATGCAGCCTTTACAGATGCATTGCATC AAACAGCGGCGGCAGGATATCAAGCAGGAGCATGC

Tabla IV.- Secuencias conservadas dentro del transcrito de Dscam de *Crassostrea* spp. localizadas en la región que amplifica el dominio TM y el tallo citoplasmático.

Tamaño (pb)	Posición	Secuencia
68	3282-3349	TACATCATGATTCCTCTCTGTTTTGGAATTGTTGCTTTCCCTCATT CTCATCATTGCAGTATTACTCTA
64	3361-3424	GAAGGGAGCTCATTCAAATGAAAGAAAGTGCCTCAAACCTGA GGAGAGACATAACTGCTGAGAC
68	3426-3493	TCCTTGATGAATGACCTTGACAAACGTTTCAACTTTGACTTTGA TGGAGGAAATACTGAGCCGTACGG
59	3501-3559	AATGTCAACTTGCTGATTTTCATTCAACTCTGATGAGAATTTGAC CAACAACAGTCCTAC
86	3603-3688	TCCATCAGCCGCTCAGAAGATGATGGAAACATCAACCCTTATGC CACATTTAACCAGATGAAGCAGGTGATCATGGAGAAAGAACA
32	3690-3721	CAGTCAGAGCGAGACAAATCCCCAGACCTGGA
50	3723-3772	GACATCAGTCTGCAGAACTCGAAGCTCAAAAAGCAATGATAT CTCCATC
17	3792-3808	TTTCATGCTAAGGGAGA
19	3810-3829	AATGGAGATGTTGCCAAAGA
44	3843-3886	CTCATTCTCTCAAGACGACCGAGGGCTACGACAACCAAGGACT
20	3888-3907	ATTCTGAGCCCCAGGAAGTA

7.2 Localización de Dscam en los tejidos de *C. gigas* y *C. corteziensis* por H. *in situ*.

Las secuencias de regiones conservadas fueron agrupadas para diseñar dos sondas de mayor tamaño, denominadas A y G de 575 y 370 pb, respectivamente (Figs. 10 y 11).

```

          65      75      85      95      105      115
Gig  ---AGGAGT CAGCTTGAC TGAGGACAGT GAGCCTAGGA TGCTTTGGAA TCTGGACTGG
Cor  CGACAGGAGT CAGCTTGAC TGAGGACAGT GAGCCTAGGA TGCTTTGGAA TCTGGACTGG
Con  CGACAGGAGT CAGCTTGAC TGAGGACAGT GAGCCTAGGA TGCTTTGGAA TCTGGACTGG
Gig  GGTCCCAGAG CTATAGTGA CCACGTTCTG TCACTTTAAC CATGTGAAAG ATCGGAGGCG
Cor  GGTCCCAGAG CTATAGTGA CCACGTTCTG TCACTTTAAC CATGTGAAAG ATCGGAGGCG
Con  GGTCCCAGAG CTATAGTGA CCACGTTCTG TCACTTTAAC CATGTGAAAG ATCGGAGGCG
Gig  GTGGATTCTG CACGATGTTA AGGCTGCTCC GACCTGTTTT AGTGCTGGCT TTTTATTG
Cor  GTGGATTCTG CACGATGTTA AGGCTGCTCC GACCTGTTTT AGTGCTGGCT TTTTATTG
Con  GTGGATTCTG CACGATGTTA AGGCTGCTCC GACCTGTTTT AGTGCTGGCT TTTTATTG
Gig  GTTCTTAAA AGCTAAACT ACGGAATCGC CGTTGACAT AATCGGGGA CCTATATTT
Cor  GTTCTTAAA AGCTAAACT ACGGAATCGC CGTTGACAT AATCGGGGA CCTATATTT
Con  GTTCTTAAA AGCTAAACT ACGGAATCGC CGTTGACAT AATCGGGGA CCTATATTT
Gig  TAACGAACC TCCCTCCTCT CTAGACTTCG CCAACACCA AGGCGCTCC GTCCAATGTA
Cor  TAACGAACC TCCCTCCTCT CTAGACTTCG CCAACACCA AGGCGCTCC GTCCAATGTA
Con  TAACGAACC TCCCTCCTCT CTAGACTTCG CCAACACCA AGGCGCTCC GTCCAATGTA
Gig  CAGCTCACGG TCAGCCCCT CCGACTTTGG ACTGGTAAA AGACGATGAT ACCCCGCTAG
Cor  CAGCTCACGG TCAGCCCCT CCGACTTTGG ACTGGTAAA AGACGATGAT ACCCCGCTAG
Con  CAGCTCACGG TCAGCCCCT CCGACTTTGG ACTGGTAAA AGACGATGAT ACCCCGCTAG
Gig  AAGATGTATC CCAAATCCTC AAGGTTCTAC CCAACAAC ATTGCACTTT TATCCCTTTA
Cor  AAGATGTATC CCAAATCCTC AAGGTTCTAC CCAACAAC ATTGCACTTT TATCCCTTTA
Con  AAGATGTATC CCAAATCCTC AAGGTTCTAC CCAACAAC ATTGCACTTT TATCCCTTTA
Gig  AGCGGAGT-G ATTTCCAAG CAAAGTACAT GCAGCCTCT ACAGATGCAT TGCATCAAAC
Cor  AGCKKARTTR AWWTCCAAG CAAAGTACAT GCAGCCTCT ACAGATGCAT TGCATCAAAC
Con  AGCGGAGTTG ATTTCCAAG CAAAGTACAT GCAGCCTCT ACAGATGCAT TGCATCAAAC
Gig  AGCGCGGCA GGATATCAAG CAGGAGCATG CCCGTTAAAG C-----
Cor  AGCGCGGCA GGATATCAAG CAGGAGCATG CCGTTAA- -----
Con  AGCGCGGCA GGATATCAAG CAGGAGCATG CCGTTAAAG CTGTTCAAG TCCGGCTGA
545      555      565      575      585      595

```

Figura 10. Región conservada localizada en el péptido señal y el dominio Ig1. Se muestra la secuencias obtenidas de *Crassostrea gigas* (Gig), *C. corteziensis* (Cor) y la secuencia consenso.

```

3185      3195      3205      3215      3225      3235
Gig MWGRMTCRYG MTGRWCCGRY CAASCWMWCA CARAYGRTGM CKGRTCWRWCW GWGWGCGAGC
Cor CTGGTACGTG ATGTA--AGT CAAG-GCTCA CAG-TGAGGC CGGATCAACA GAGAGCGAGC
Con CTGGTACGTG ATGWACCRGT CANKCGCTCA CAGATGAYGC CGGATCAACA GAGAGCGAGC
Gig TCAAGTTGGA AGGAGGA--G AGTAACTTCT ATGAGAAGAC GTACATCATG ATTCCTCTCT
Cor TCAAGTTGCC GGAAGGAAGA AGTAACTTCT ATGAGAAGAC ATACATCATG ATTCCTCTCT
Con TCAAGTTGSM RGRAGGAAGR AGTAACTTCT ATGAGAAGAC RTACATCATG ATTCCTCTCT
Gig GTTTTGGAAT TGTGCTTTC CTCATTCTCA TCATTGCAGT ATTACTCTAC ATGAGGCGTA
Cor GTTTTGGAAT TGTGCTTTC CTCATTCTCA TCATTGCAGT ATTACTCTAT ATGAGGCGGC
Con GTTTTGGAAT TGTGCTTTC CTCATTCTCA TCATTGCAGT ATTACTCTAT ATGAGGCGDM
Gig GAAGGGAGCT CATTCAAATG AAAGAAAGTG CCTCAAACCT GAGGAGAGAC ATAACTGCTG
Cor GAAGGGAGCT CATTCAAATG AAAGAAAGTG CCTCAAACCT GAGGAGAGAC ATAACTGCTG
Con GAAGGGAGCT CATTCAAATG AAAGAAAGTG CCTCAAACCT GAGGAGAGAC ATAACTGCTG
Gig AGACTTCCTT GATGAATGAC CTTGACAAAC GTTCAAACCT TGACTTTGAT GGAGGAAATA
Cor AGACTTCCTT GATGAATGAC CTTGACAAAC GTTCAAACCT TGACTTTGAT GGAGGAAATA
Con AGACTTCCTT GATGAATGAC CTTGACAAAC GTTCAAACCT TGACTTTGAT GGAGGAAATA
Gig CTGAGCCGTA CGGGAAGAGA AATGTCAACT TGCTGATTC ATTCAACTCT GATGAGAATT
Cor CTGAGCCGTA CGGCAAGAGG AATGTCAACT TGCTGATTC ATTCAACTCT GATGAGAATT
Con CTGAGCCGTA CGGSAAGAGR AATGTCAACT TGCTGATTC ATTCAACTCT GATGAGAATT
Gig TGACCAACA CAGTCCTACT TGGCTGAACA ATGGATCCAG CAAGACTAAC AGTGACAATG
Cor TGACCAACA CAGTCCTACA TGGCTGAACA ATGGATCCAG CAAGACTAAC AGTGACAATG
Con TGACCAACA CAGTCCTACN TGGCTGAACA ATGGATCCAG CAAGACTAAC AGTGACAATG
Gig GGTCATCAG CCGCTCAGAA GATGATGGAA ACATCAACC TTATGCCA TTTAACCAGA
Cor GGTCATCAG CCGCTCAGAA GATGATGGAA ACATCAACC TTATGCCA TTTAACCAGA
Con GGTCATCAG CCGCTCAGAA GATGATGGAA ACATCAACC TTATGCCA TTTAACCAGA
Gig TGAAGCAGGT GATCATGGAG AAAGAACAGC AGTCAGAGCG AGACAAATCC CCAGACCTGG
Cor TGAAGCAGGT GATCATGGAG AAAGAACAGC AGTCAGAGCG AGACAAATCC CCAGACCTGG
Con TGAAGCAGGT GATCATGGAG AAAGAACAGC AGTCAGAGCG AGACAAATCC CCAGACCTGG
Gig ACGACATCAG TCTGCAGAAA CTCGAAGCTC AAAAAGCAAT GATATCTCCA TCGGAACCCCT
Cor ACGACATCAG TCTGCAGAAA CTCGAAGCTC AAAAAGCAAT GATATCTCCA TCGAGCCCT
Con AYGACATCAG TCTGCAGAAA CTCGAAGCTC AAAAAGCAAT GATATCTCCA TCRGARCCCT
Gig ATGTGCCTTT CTTTCATGCT AAGGGAGATA ATGGAGATGT TGCCAAAGAC CCCCATCCTC
Cor ATGTGCCTTT CTTTCATGCT AAGGGAGAYA ATGGAGATGT TGCCAAAGAY CCCCATCCTC
Con ATGTGCCTTT CTTTCATGCT AAGGGAGATA ATGGAGATGT TGCCAAAGAC CCCCATCCTC
Gig CACTCATTC TCTCAAGACG ACCGAGGGCT ACGACAACA AGGACTGATT CTGAGCCCCA
Cor CACTCATTC TCTCAAGACG ACCGAGGGCT ACGACAACA AGGACTTATT CTGAGCCCCA
Con CRCTCATTC TCTCAAGACG ACCGAGGGCT ACGACAACA AGGACTKATT CTGAGCCCCA
Gig GGAAGTATGC CAGCGCTGAA -----
Cor GGAAGTATGC CAGCGCTGAC CAGATCCATG CCCTGTTTAC CCAGGTCCCA GCCAGACCCC
Con GGAAGTAYGC CAGCGCTGAM CAGATCCAYG CCCTGTTTAC CCAGGTCCCA GCCAGACCCC
3195      3205      3215      3225      3235

```

Figura 11. Región conservada localizada en el dominio transmembrana y tallo citoplasmático. Se muestra la secuencias obtenidas de *Crassostrea gigas* (Gig), *C. corteziensis* (Cor) y la secuencia consenso.

Se logró la amplificación y el marcaje con digoxigenina de ambas sondas, a partir de una mezcla de ADNc de *C. gigas* y *C. corteziensis* (Fig. 12), utilizando el protocolo descrito en la sección de métodos.

Una vez realizado el procedimiento de hibridación *in situ*, las laminillas fueron revisadas en un microscopio Olympus BX41. Las imágenes fueron capturadas a través de una cámara digital Cool SNAP-Pro con el programa Image-Pro Plus versión 6.0.

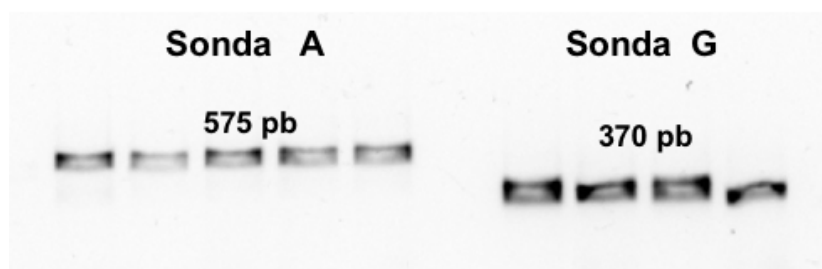


Figura 12. Amplificación por PCR de las sondas A y G. Por medio de electroforesis en gel de agarosa se verificó la ausencia de productos inespecíficos y el tamaño molecular de los productos obtenidos.

Para elegir la sonda con mayor intensidad de señal, se eligieron dos laminillas del mismo individuo, de cada especie, y para cada sonda (A y G), es decir, ocho laminillas en total. Únicamente se muestran los resultados del manto de *C. gigas* infectado comparado con un control negativo de reacción (sin sonda marcada) (Fig. 13). La sonda A mostró una mayor intensidad de señal en el tejido conectivo del manto de *C. gigas* y *C. corteziensis*, por lo que los ensayos posteriores fueron realizados con dicha sonda.

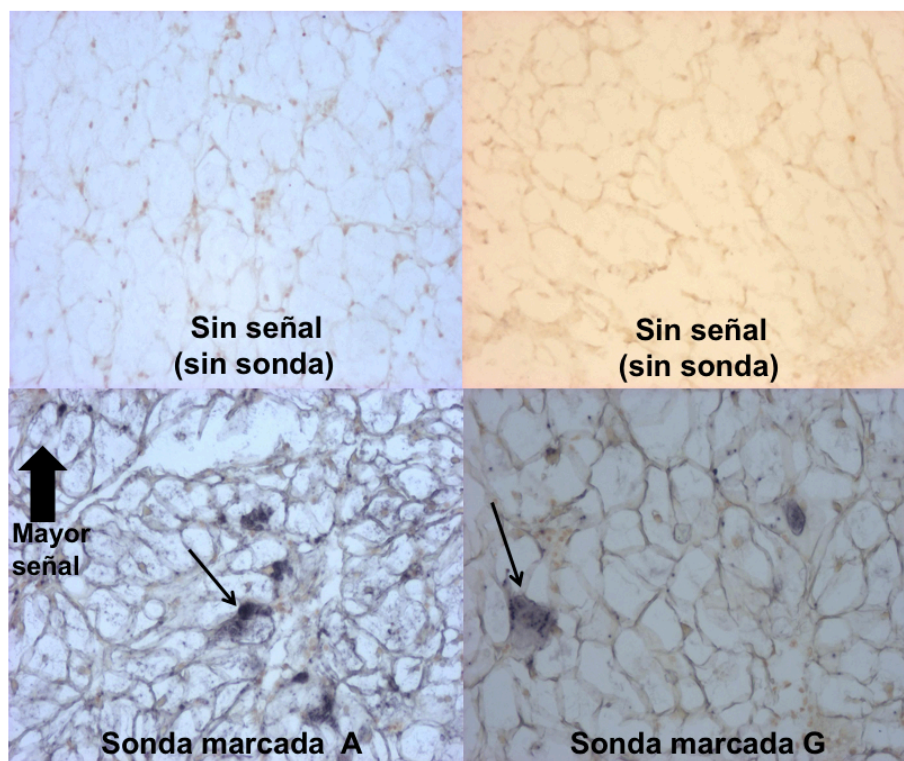


Figura 13. Comparación de intensidad en la señal de Dscam por hibridación *in situ* en tejido conectivo de manto infectado de *Crassostrea gigas* (200X). En la parte superior de la imagen se muestra el control negativo (sin sonda), en la parte inferior del lado izquierdo sonda A, en comparación con la sonda G del lado derecho.

Para determinar la localización de Dscam en tejidos de *C. gigas* se utilizaron trece laminillas de individuos infectados con OsHV-1 y cuatro de individuos control (sin evidencia de patógenos). En el caso de *C. corteziensis* se utilizaron doce de individuos infectados con *P. marinus* y cuatro de individuos control. En cada laminilla se realizó el análisis del individuo completo (corte sagital). Cabe mencionar que la señal positiva para Dscam sólo se observó en organismos infectados.

La señal positiva a Dscam fue sobresaliente en algunos tejidos de *C. gigas*, como se muestra en la figura 14. Se identificó una señal de color azul en manto y oscura en branquias de ostiones infectados con OsHV-1. De manera contraria, la señal de Dscam en manto y branquias de *C. corteziensis* fue muy discreta en todos los individuos analizados.

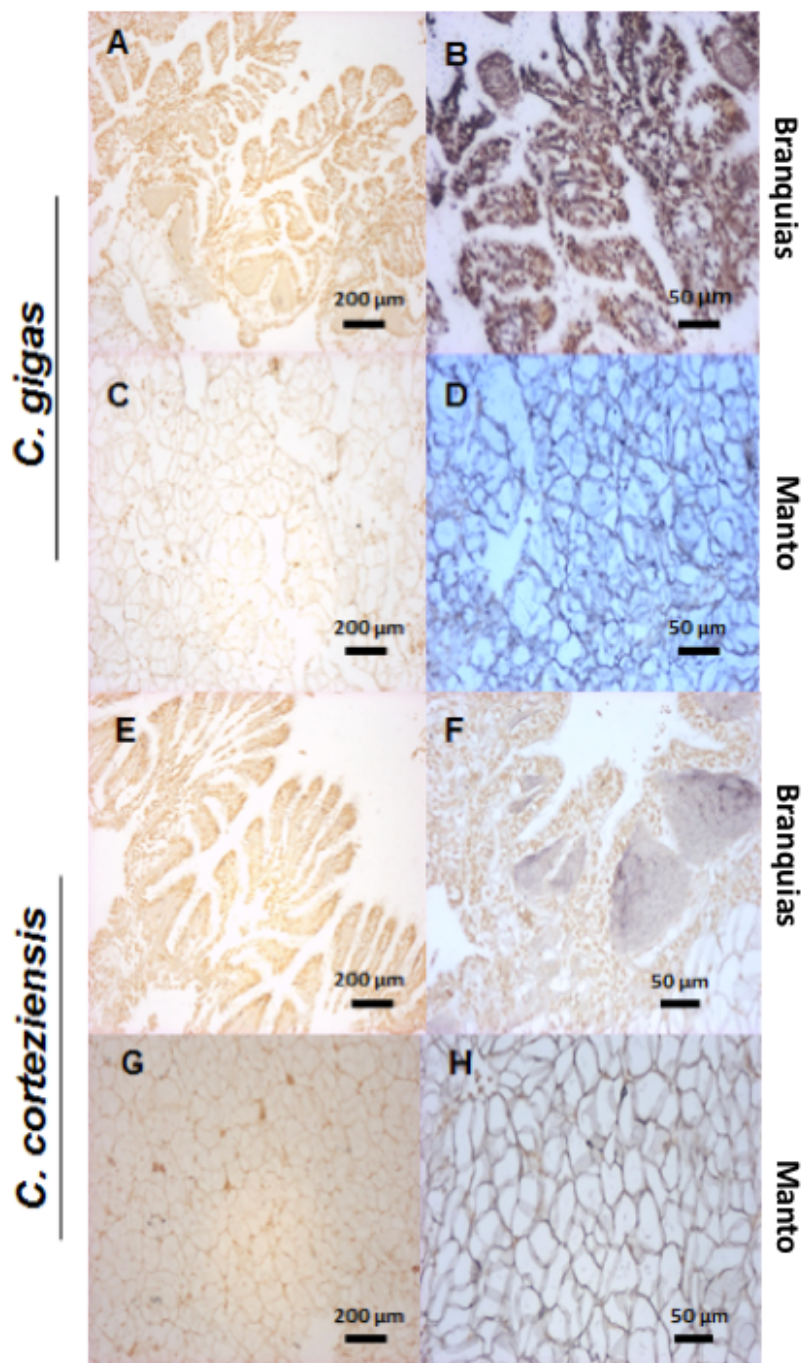


Figura 14. Señal de Dscam en los tejidos de branquias y manto (200X). Identificación de la señal positiva de Dscam en individuos de *Crassostrea gigas* (A-D) y *C. corteziensis* (E-H). La señal positiva se observa como una tinción oscura en branquias (B y F) y manto (D y H). No se registró ninguna señal en los individuos no infectados (A, C, E, G).

Se realizó un análisis exhaustivo para determinar la localización de Dscam en otros tejidos de las especies involucradas en este estudio. Aparte de branquias y manto, se identificó a Dscam en intestino y glándula digestiva (Fig. 15). Finalmente, se determinó el número de individuos con señal positiva a Dscam. Los resultados se muestran en la tabla V.

Tabla V. Tejidos con señal positiva a Dscam en *Crassostrea* spp. El signo (+) representa el número de individuos positivos, sobre el número de individuos totales analizados (n).

Tejido	Especie	
	<i>C. gigas</i> +/n	<i>C. corteziensis</i> +/n
Branquias	12/13	10/12
Manto	13/13	8/12
Intestino	8/13	5/12
Glándula digestive	6/13	3/12

Para identificar el tipo de células que expresaban la señal de Dscam se realizó una tinción de hematoxilina-eosina sobre laminillas de *C. gigas* y *C. corteziensis* de individuos sanos.

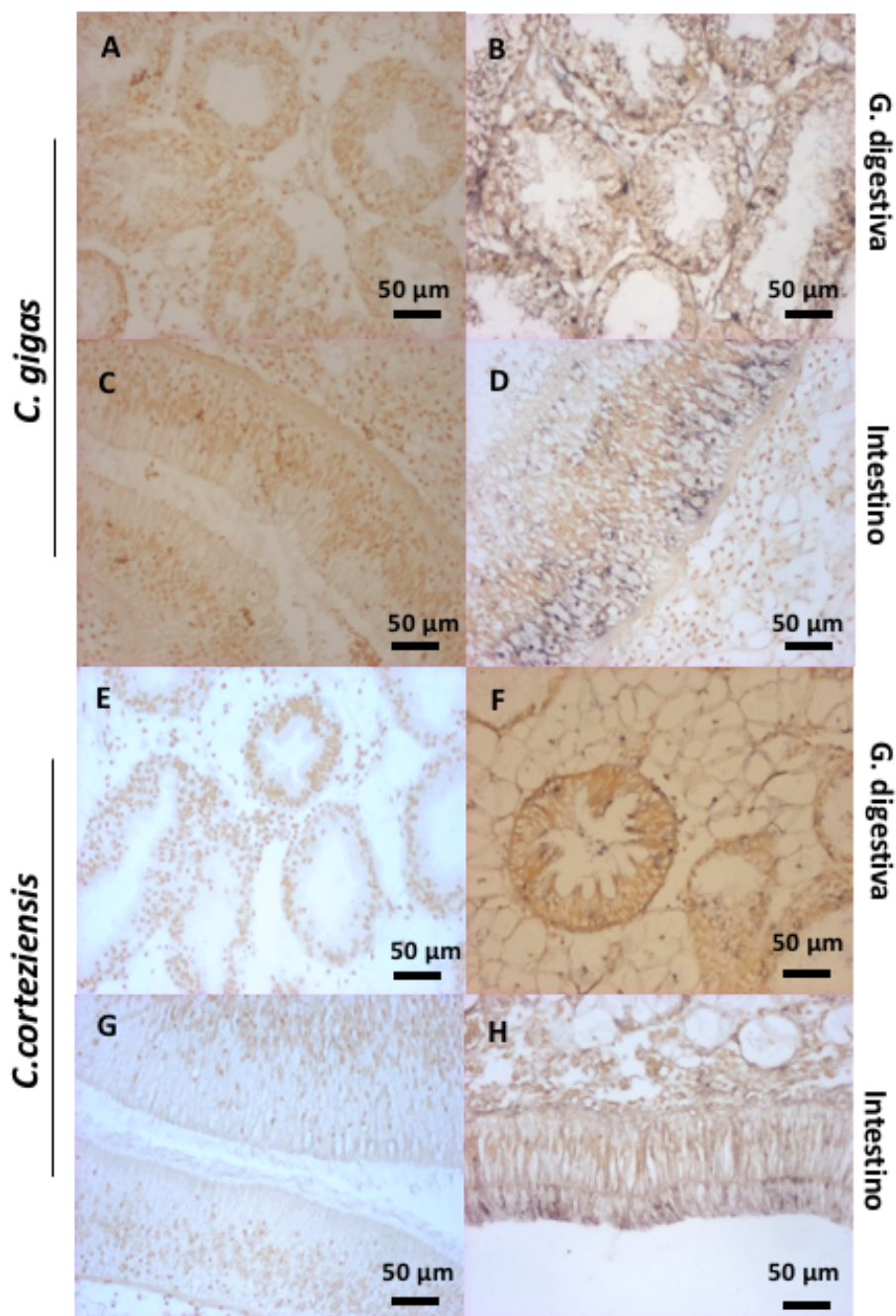


Figura 15. Expresión de Dscam en los tejidos de glándula digestiva e intestino (200X) en individuos de *Crassostrea gigas* (A-D) y *C. corteziensis* (E-H). La señal positiva se observa como una tinción oscura en glándula digestiva (B y F) e intestino (D y H). No se registró ninguna señal en los individuos no infectados (A, C, E, G).

Las imágenes mostraron que las células epiteliales (ce) (*C. gigas*) y las células luminales (*C. corteziensis*) de branquias y el tejido conectivo vesicular (tcv) de manto mostraron expresión de Dscam (Fig. 16).

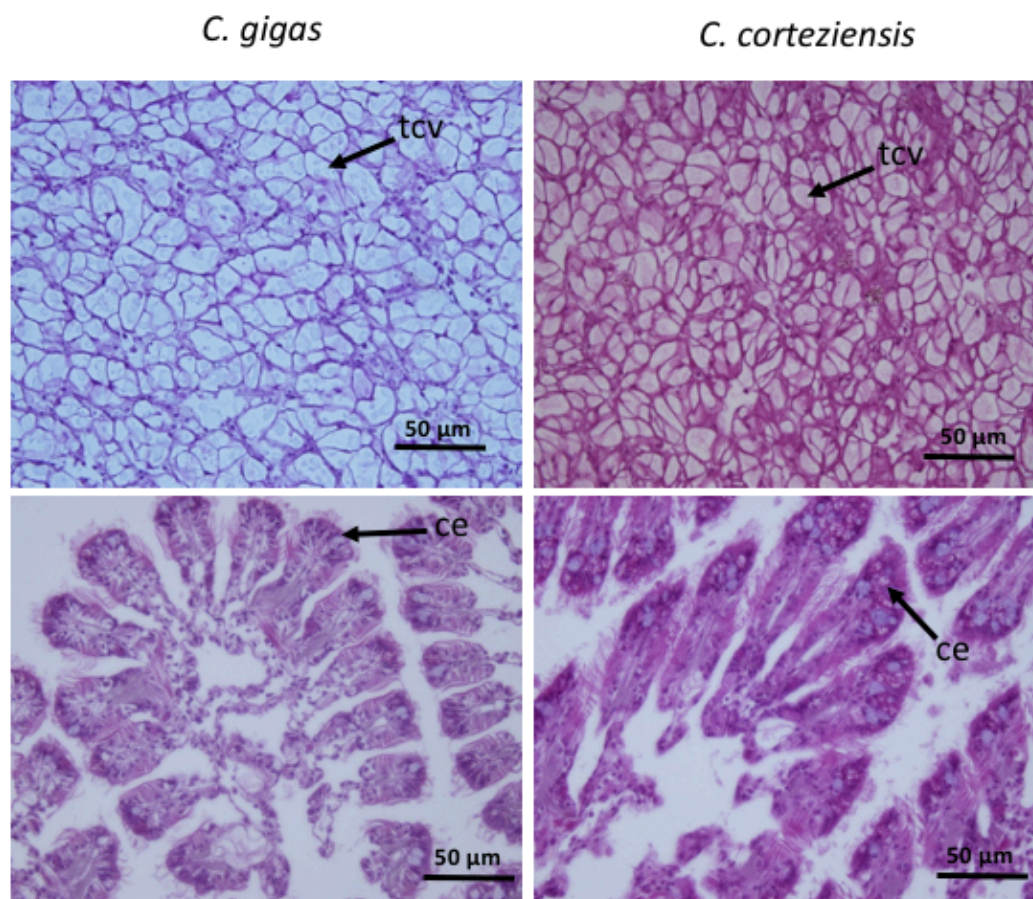


Figura 16. Tinción de hematoxilina-eosina en branquias y manto de *Crassostrea gigas* y *Crassostrea corteziensis*. En la parte superior se observa el manto, y en la inferior las branquias. Las flechas indican el tejido conectivo vesicular (tcv) y las células epiteliales (ce), respectivamente.

7.3 Determinación de los niveles de expresión génica de Dscam en branquias y manto de *C. gigas* y *C. corteziensis*

Una vez establecida la localización de Dscam en los distintos tejidos de los ostiones mediante hibridación *in situ*, se realizaron los ensayos de qPCR para determinar sus niveles de expresión génica. Para cada especie de *Crassostrea* spp. se prepararon mezclas de ADNc separadas por tejido (branquias y manto) y por condición (control e infectado). Se utilizaron cuatro pares de oligonucleótidos, factor de elongación 1-alfa (FE 1-a), tubulina alfa (Tub-a), proteína ribosomal L9 (RPL-9), proteína ribosomal L-13 (RPL-13) y gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Se realizó una prueba de PCR punto final de los diferentes genes de referencia utilizados (Fig. 17).

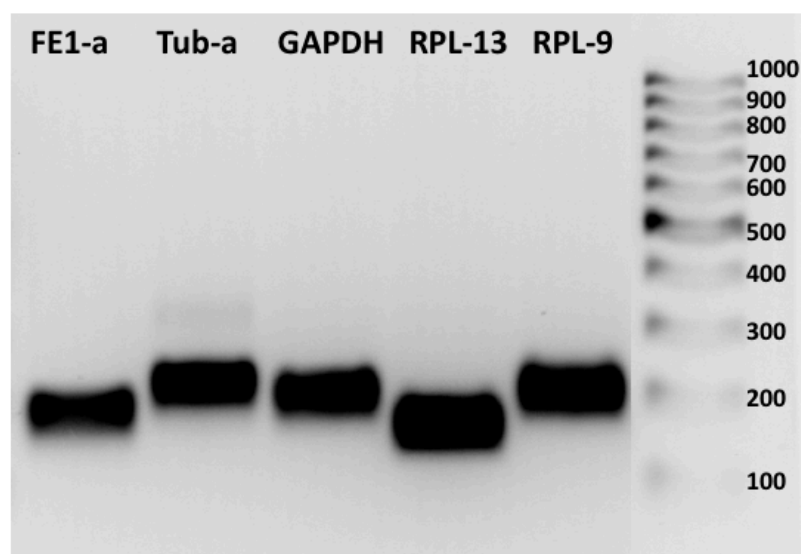



Figura 17. Análisis electroforético de los genes de referencia, para verificar el tamaño molecular y la ausencia de productos inespecíficos. De izquierda a derecha se presenta factor de elongación alfa (FE 1-a), tubulina alfa (Tub-a), gliceraldehído fosfato deshidrogenada (GAPDH), proteína ribosomal L-9 y proteína ribosomal L-13, enseguida el marcador de peso molecular de 100 pb.

Se realizaron curvas estándar (0 a 100 ng) para cada gen y para cada tejido. Se eligieron las curvas estándar de 25 ng debido a que en ellas se obtuvieron valores de eficiencia entre 99-103%, en ambas especies.

Para normalizar los datos se evaluó la estabilidad de los genes de referencia utilizados en ambos tejidos. El análisis de los datos se realizó en la página <http://leonxie.esy.es/RefFinder/>, que cuenta con los métodos ampliamente conocidos Delta CT, Best Keeper, Normfinder y Genorm.

El análisis de estabilidad utilizando los cuatro métodos, mostró que los genes de referencia más estables para manto fueron RPL9 seguido de EF-1 y RPL13, mientras que, para branquias fueron RPL13 y GAPDH (Fig. 18).



	Manto	Branquia
	RPL-13	GAPDH
	RPL-9	RPL-9
	FE-1a	RPL-13
	GAPDH	FE-1a
	TUB-a	TUB-a

Figura 18. Estabilidad de los genes de referencia en branquias y manto de *Crassostrea* spp.

Debido a los resultados anteriores, los datos para evaluar la expresión relativa de Dscam en los diferentes tejidos fueron normalizados con los genes de referencia RPL9 y GAPDH para branquia y los genes RPL9 y RPL13 para manto. El análisis de expresión de Dscam de *C. gigas* y *C. corteziensis* se muestran en la figura 19.

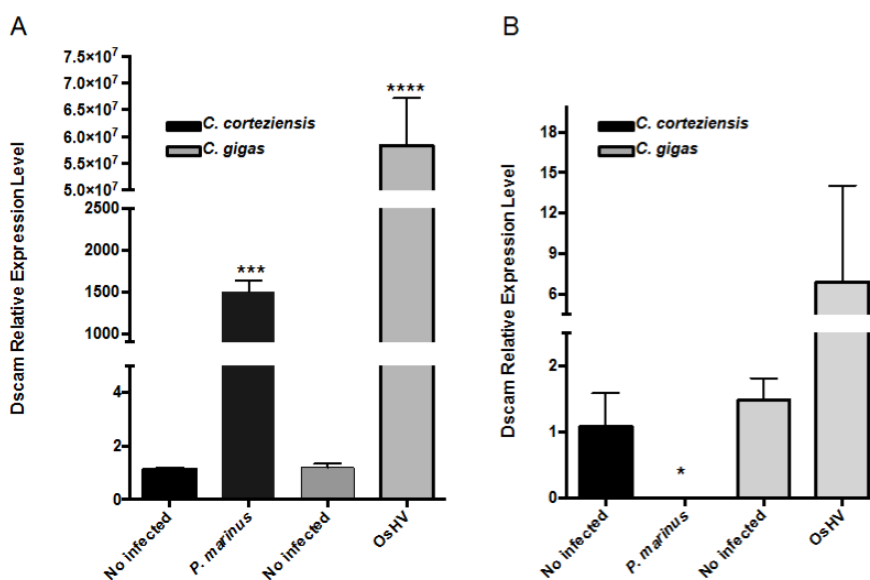


Figura 19. Expresión de Dscam en branquias y manto de *Crassostrea gigas* y *C. corteziensis*. Los niveles de expresión del transcrito de Dscam fueron cuantificados mediante qPCR en branquia (A) y manto (B) de individuos de *C. gigas* no infectados e infectados con OsHV-1, y de individuos de *C. corteziensis* no infectados e infectados con *P. marinus*. Las barras muestran la media \pm SE. Las diferencias significativas se presentan con un asterisco (*) cuando el valor de $p \leq 0.05$, tres (***) $p \leq 0.001$ y cuatro asteriscos (****) cuando $p \leq 0.0001$.

La expresión de Dscam en branquias de *C. gigas* fue significativamente mayor, 5.8×10^6 veces de cambio ($p = 0.001$) en individuos infectados, mientras que la expresión en *C. corteziensis* fue de 1499 veces de cambio ($p = 0.001$), respecto a los controles. La expresión de Dscam en manto de *C. gigas* infectado se incrementó 4.6 veces de cambio, en comparación con el control, sin embargo, no hubo diferencia significativa. Finalmente, en manto infectado de *C. corteziensis* los niveles de expresión de Dscam mostraron un decaimiento significativo ($p < 0.05$) respecto a los individuos control.

7.4 Evaluación de la expresión de genes de respuesta inmune durante la exposición a *E. coli*

Los genes con función inmune, Dscam, TLR2, FREP e IL-17-3, se evaluaron de manera individual en branquias y manto de los 60 ostiones (grupo control e inoculados con *E. coli*) utilizados en el bioensayo. Al igual que Dscam, se ha señalado que las familias de genes inmunes como FREP, TLR e Interleucina 17 (IL-17) presentan un proceso de diversificación (Zhang *et al.*, 2015), para conferir especificidad de la respuesta inmune innata en invertebrados y que su respuesta es tejido específica y su perfil de expresión varía dependiendo del tiempo de infección. Por lo tanto, resultó interesante de observar sus niveles de expresión a distintos tiempos post-infección.

Los resultados de expresión génica en branquia de *C. gigas* se pueden apreciar en la figura 20. Los niveles de expresión de Dscam no presentan cambios en el grupo control durante todo el experimento. En branquias infectadas, se observó un pico máximo de expresión a las 12 h ($p = 0.004$), seguido por un decaimiento a las 24 h ($p = 0.022$) y 48 h ($p = 0.007$) todos los cambios fueron estadísticamente significativos.

La expresión de TLR2 muestra una respuesta inmediata a la inoculación de *E. coli*. Se observaron niveles altos de expresión durante todo el ensayo, con un pico máximo de expresión a las 12 h. En el grupo control no se observaron cambios.

Los niveles de expresión de FREP mostraron fluctuaciones en el grupo de individuos infectados durante todo el ensayo, es decir, mostraron gran variabilidad individual. Los cambios significativos se observaron a las 8 h ($p = 0.029$), 12 h ($p = 0.01$) y 24 h ($p = 0.001$), el pico máximo de expresión se observó a las 24 h. En el caso del grupo control, los niveles de expresión reflejan variaciones que no representaron diferencia significativa.

Por último, en el análisis de los niveles de expresión de IL-17-3 en branquia, se observaron bajos niveles a las 4 h ($p = 0.008$) y 8 h ($p = 0.001$) comparados con el grupo control.

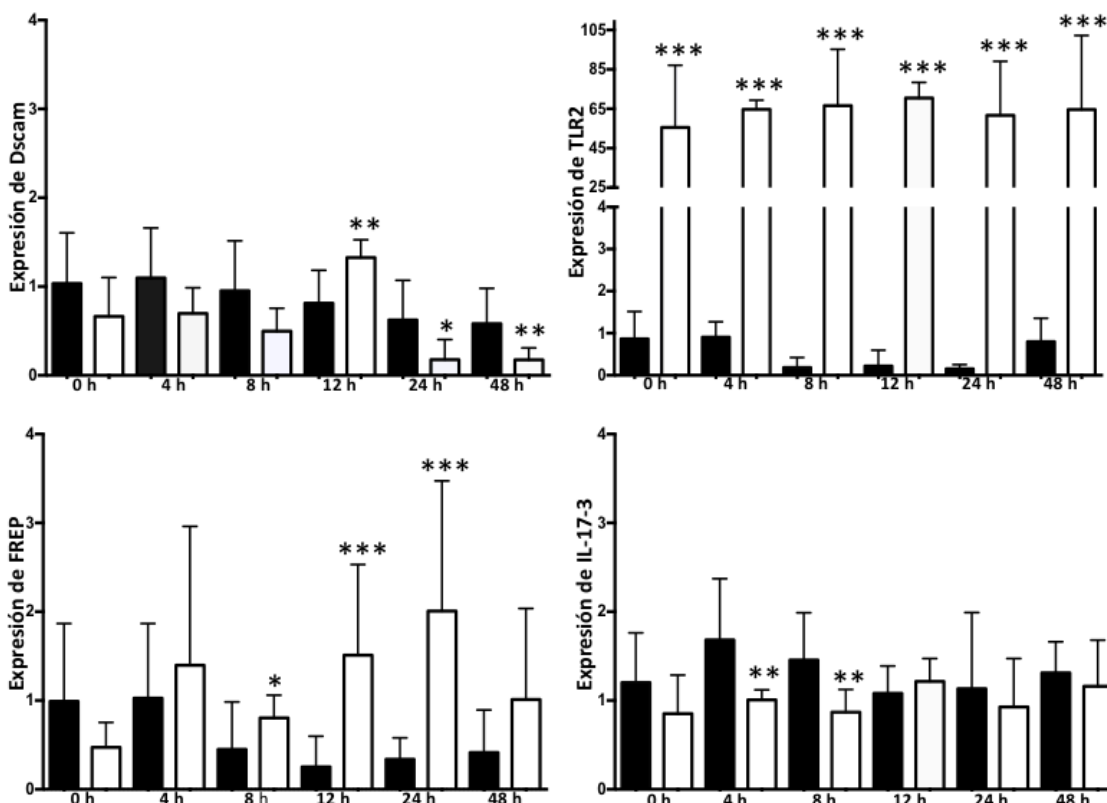


Figura 20. Efecto de la infección por *Escherichia coli* en la expresión de genes de respuesta inmune en branquias de *Crassostrea gigas*. Los niveles de expresión de Dscam fueron cuantificados a las 0, 4, 8, 12, 24 y 48 h en distintos tiempos posteriores a la infección con *E. coli*. Las barras negras muestran el tejido de branquias control y las barras blancas infectadas con *E. coli*. Las barras muestran la media \pm SE. Los asteriscos representan los siguientes valores: * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$) y *** ($p \leq 0.001$).

Los niveles más altos de expresión de los genes de respuesta inmune evaluados se observaron en el tejido en manto infectado (Fig. 21).

Los niveles de expresión de Dscam, no evidenciaron cambios en el grupo control. En el grupo de ostiones infectados se observó un incremento gradual a las 0 h ($p = 0.001$), 4 h ($p = 0.001$), 8 h ($p = 0.001$) y 12 h ($p = 0.001$), en este último tiempo se observó el pico

máximo de expresión. Los tiempos 24 h ($p = 0.001$) y 48 h ($p = 0.001$) mostraron una reducción significativa en los niveles de expresión en comparación con el grupo control.

La expresión de TLR2 se incrementó de manera significativa durante todas las horas evaluadas. Los niveles de mayor expresión se evidenciaron a las 0h ($p = 0.001$) y 24 h ($p = 0.001$). No se observaron cambios significativos en los organismos control.

Los niveles de mayor de expresión de FREP se observaron a las 4 h ($p = 0.005$), 24 h ($p = 0.001$) y 48 h ($p = 0.018$) en comparación con el grupo control.

Por último, los niveles de expresión de IL-17 se elevaron de manera inmediata después de la inoculación con *E. coli* al tiempo 0 ($p = 0.001$). Una disminución significativa se observó a las 8 h ($p = 0.0006$), y finalmente, un pico máximo de expresión a las 48 h ($p = 0.001$).

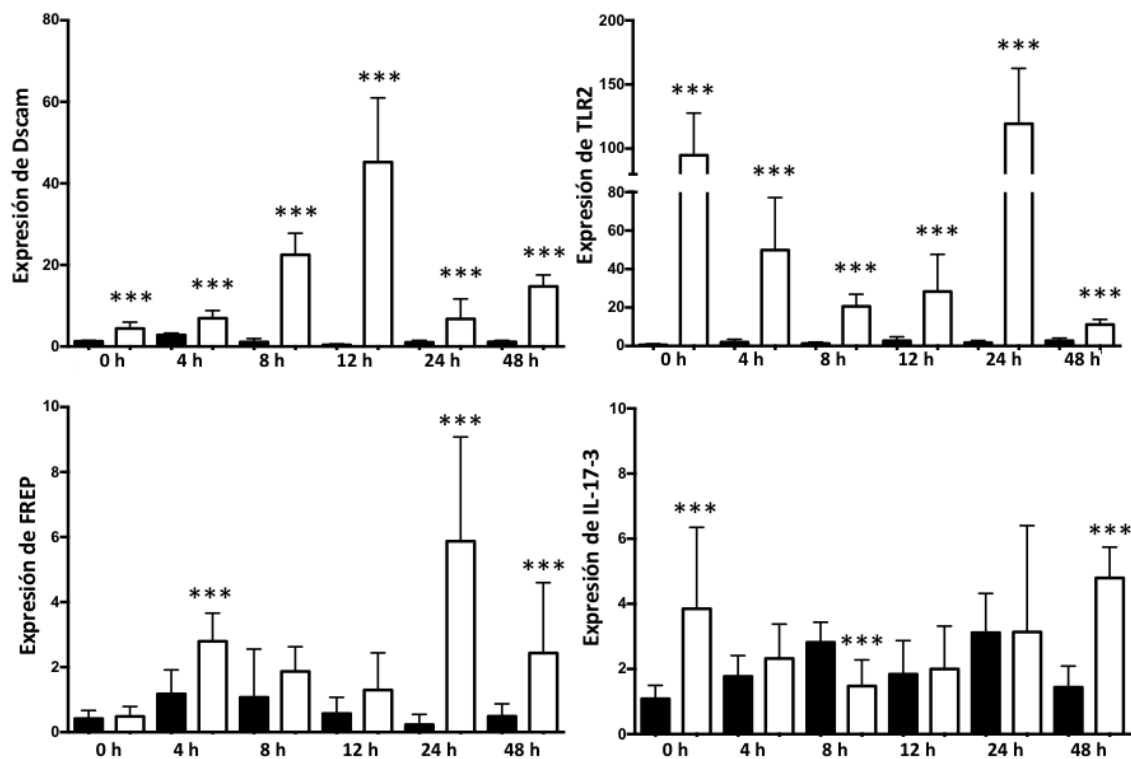


Figura 21. Efecto de la infección por *Escherichia coli* en la expresión de genes de respuesta inmune en manto de *Crassostrea gigas*. Los niveles de expresión de Dscam fueron cuantificados a las 0, 4, 8, 12, 24 y 48 h posteriores a la infección con *E. coli*. Las barras negras muestran el tejido de manto control y las barras blancas infectado con *E. coli*. Las barras muestran la media \pm SE. Los tres asteriscos (***) representan un valor de ($p \leq 0.001$).

8. DISCUSIÓN

Los hallazgos de Dscam en otros invertebrados, condujeron a la búsqueda de Dscam en las especies de *Crassostrea* spp. Como se mencionó anteriormente existe una secuencia depositada en GenBank de Dscam de ganglio visceral de *C. gigas*, pero no existe información disponible acerca de las condiciones experimentales y técnicas por las cuales se obtuvo dicha secuencia. El reporte consiste en un resumen presentado en un congreso y no existe como publicación formal (Gorbushing e Iakloveva, 2013). En general, se desconocía si Dscam se expresaba en otras especies de *Crassostrea*, sus niveles de expresión en condiciones control y/o infectados, la existencia de isoformas y su posible participación en la respuesta frente a patógenos, por tanto, este trabajo aporta algunos hallazgos de la presencia y posible participación de Dscam en la respuesta inmune de *Crassostrea* spp. frente a patógenos virales, bacterianos y parasitarios.

En este trabajo se lograron amplificar los dominios de Dscam en branquias, manto y glándula digestiva y semilla de *Crassostrea* spp., aunque sólo se secuenciaron los productos de PCR provenientes de branquias. El análisis de las secuencias obtenidas de Dscam de *Crassostrea gigas*, *C. corteziensis* y semilla de *C. sikamea*, mostró una organización en los dominios de Dscam conservada. Se identificaron ocho dominios inmunoglobulina (Ig), cuatro dominios FNIII, un dominio TM y un tallo citoplásmico como ha sido reportado en artrópodos (Chiang *et al.*, 2013; Chou *et al.*, 2011; Hung *et al.*, 2013;), Ng *et al.*, 2015; Schmucker *et al.*, 2009; Yamakawa *et al.*, 1998). La amplificación de los dominios variables Ig3 e Ig7 de Dscam presentó dificultades, los electroferogramas mostraban más de un pico en una misma posición. Esto podría deberse a la unión deficiente de los oligonucleótidos sobre la secuencia del ADN, además las variantes que existen entre los dominios, dificultan el diseño de oligonucleótidos específicos para su amplificación. Probablemente la secuenciación de fragmentos de mayor longitud con

tecnologías de nueva generación (como PACBIO) podría proporcionar mejores resultados (Rhoads y Au-KF, 2015).

Se logró la identificación de dos regiones conservadas, una de 507 pb localizada en el péptido señal y dominio Ig1, y otra de 490 pb ubicada en el dominio TM y tallo citoplasmático. Nuestros resultados coinciden en longitud aproximada a las reportadas, aunque con una localización diferente a las regiones conservadas identificadas en *L. vannamei* (469 pb), ubicada en el dominio Ig8 al dominio 4 de FNII, y en *P. monodon* (491 pb), localizada en la región del dominio Ig4 al dominio Ig6 (Chou *et al.*, 2009; 2011).

Identificamos la expresión de Dscam en tejido de individuos completos de *Crassostrea* spp. mediante hibridación *in situ*. Los tejidos infectados de manto, branquias, glándula digestiva y gónada de *C. gigas* y *C. corteziensis* mostraron señal positiva para Dscam. La intensidad de señal observada preferentemente en los tejidos de manto y branquia infectados, coinciden con la afinidad que muestran OsHV-1 y *P. marinus* a estos tejidos durante algunas etapas del proceso infeccioso. Es importante mencionar que no se identificó señal positiva para Dscam en organismos control, aunque se utilizó una sonda específica durante los ensayos. La falta de un anticuerpo Anti-Dscam específico para Dscam de *Crassostrea* spp., limita el uso de técnicas como ELISA, inmunoperoxidasa e inmunohistoquímica para cuantificar los niveles de proteínas de Dscam. Por este motivo se realizaron ensayos de qPCR para evaluar la expresión de Dscam en branquias y manto de ambas especies observados por hibridación *in situ*.

Los resultados de qPCR revelaron un fuerte incremento en los niveles de expresión de Dscam en branquias infectadas con OsHV-1. Posiblemente porque es el resultados de una infección reciente, ya que las branquias mantienen un intercambio constante con el medio exterior y es la entrada principal de patógenos (Allam y Raftos, 2016; Allam y Pales-Espinoza, 2015). Durante el proceso de detección de patógenos se amplificó la subunidad catalítica de la ADN polimerasa del OsHV-1 (Davison *et al.*, 2005; Webb *et al.*, 2007); se ha

descrito que es un gen de respuesta temprana en procesos de infección (Segarra *et al.*, 2014). Por último, Evans *et al.* (2017), reportaron que los límites de detección cuantificables de carga viral de ADN OsHV-1 son mayores en branquia en comparación con otros órganos como manto y músculo abductor. En manto los niveles de expresión de Dscam fueron menores, esta diferencia puede estar asociada con la menor abundancia del OsHV-1. Recientemente, Martenot *et al.* (2016), reportaron una disminución de los genes de expresión viral a las 24 horas posteriores a la infección en las branquias, pero un incremento en el número de copias virales en el manto infectado de semillas de *C. gigas*. Estas evidencias sugieren que los genes virales se expresan de manera diferencial de acuerdo a la etapa de la infección (He *et al.*, 2015). Los hallazgos mostrados en este trabajo sugieren la relación entre la presencia de patógenos y los niveles de expresión de Dscam, sin embargo, es necesario evaluar los niveles de expresión de Dscam en las diferentes tallas de *C. gigas* así como en las diferentes etapas de la infección viral.

El análisis de hibridación *in situ* en *C. corteziensis* reflejó una menor intensidad en la señal de Dscam. De igual manera, la señal se localizó mayoritariamente en branquias y manto. Los niveles de expresión de Dscam en branquias infectadas con *P. marinus* reflejan cambios significativos, sin embargo, en el caso de manto se observó un decaimiento en la expresión de Dscam en comparación con los individuos control.

Los resultados observados podrían estar relacionados con la resistencia de *C. corteziensis* a la infección de *P. marinus* (Gutiérrez *et al.*, 2015; Tanguy *et al.*, 2004). Los niveles de expresión son consistentes con un bajo nivel de infección. Los mecanismos que confieren resistencia a *C. corteziensis* no han sido determinados, sin embargo, se ha reportado que *C. gigas* es menos susceptible a la presencia de *P. marinus* en comparación con *C. virginica*. Guo *et al.* (2015), reportaron que la glándula digestiva es un órgano blanco para la infección de *P. marinus*, por lo que en futuros estudios debe considerarse la evaluación de la expresión de Dscam en glándula digestiva en presencia de *P. marinus*.

La inhibición de Dscam observada en manto infectado podría ser un mecanismo inducido por la presencia de *P. marinus*. Esto podría estar relacionado con la distribución en el tejido y/o con el patógeno presente.

Algunos reportes evidencian disminución en la expresión de Dscam en presencia de ciertos patógenos. Por ejemplo, en *S. paramamosain* infectado con el análogo sintético de RNA de doble cadena, Poly I:C, los niveles de expresión de Dscam en cerebro se incrementaron a las 6, 12, 48 y 96 h posteriores a la infección, mientras que se observó una disminución en hemocitos en todas las horas evaluadas (Li *et al.*, 2017). En hemocitos de *L. vannamei* y *P. leniusculus* inoculados con WSSV, se reportó un decaimiento y ausencia de expresión de Dscam, respectivamente. Hasta el momento no existe información acerca de los mecanismos de transcripción que inducen este efecto en la regulación de Dscam (Watthanasurorot *et al.*, 2011; Hung *et al.*, 2013). Tampoco se conocen los mecanismos de inhibición ó defensa inducidos por *P. marinus* en *C. corteziensis*.

Los reportes en crustáceos, sugieren que Dscam tiene una respuesta eficiente frente a bacterias y limitada en presencia de virus. Nuestros resultados muestran que también la presencia de OsHV-1 en *C. gigas* tiene efecto en su expresión, aunque aún se debe evaluar si Dscam en *C. gigas* participa en la unión y eliminación de virus.

Para evaluar si Dscam participa en procesos de infección aguda, su expresión fue evaluada durante el proceso de exposición a una bacteria Gram negativa (*E. coli*), también se incluyeron a los receptores TLR2 y FREP, así como la interleucina IL-17-3 por su reciente evidencia de diversificación inmune para conferir cierta especificidad en procesos con LPS de *E. coli*.

Se conoce que las especies de *Vibrio* y Herpes virus, son los patógenos más importantes en la acuicultura de bivalvos. *E. coli* es una bacteria gram negativa al igual que *Vibrio* spp, que hasta ahora se ha considerado como no patógena en ostiones. El gran interés que hay por esta bacteria en cultivo de moluscos es únicamente desde una perspectiva de salud pública, ya que los ostiones por sus hábitos alimenticios pueden ser portadores de patógenos para el humano. Sin embargo, en el grupo de trabajo, recientemente se aisló una cepa bacteriana con capacidad de causar mortalidad en *C. gigas* durante experimentos de reto, la cual fue identificada por pruebas bioquímicas y fisiológicas como *E. coli* y posteriormente confirmado con la secuenciación de su genoma (Savin-Amador, 2015; resultados no publicados). Por esta razón, decidimos evaluar la respuesta de Dscam y otros genes inmunes en presencia de esta cepa de *E. coli*, como modelo experimental reto con una bacteria patógena. Aún falta determinar si la presencia de *E. coli* constituye un riesgo para *C. gigas*. Hasta el momento la presencia de este coliforme en *C. gigas* se asocia con la descarga de agua contaminada en áreas asignadas al cultivo (Derolez *et al.*, 2013; Vega *et al.*, 2013; Vega y Marín, 2014).

Los resultados mostraron bajos niveles de expresión de Dscam en branquias en todas las horas evaluadas bajo estas condiciones de ensayo. Esto sugiere que Dscam no participa de manera inmediata en la exposición a *E. coli*. Los niveles de expresión de Dscam en manto fueron más altos en comparación con branquias, contrariamente a lo observado en *C. gigas* infectado con OsHV-1.

Las diferencias observadas en los patrones de expresión podrían estar asociados con la respuesta a *E. coli*. Schwarz y Evans (2013) sugieren que las poblaciones de transcritos de Dscam están relacionadas con los requerimientos de cada proceso infeccioso.

En este estudio, la expresión de TLR2 sugiere una alta capacidad de reconocimiento a ligandos de *E. coli*, que podrían estar asociada a su localización subcelular y afinidad de unión de los receptores tipo Toll (Zhang *et al.*, 2013). Los autores encontraron que los

TLRs están distribuidos principalmente en endosomas tardíos y membrana plasmática, además de que los patrones de expresión de mensajeros de TLRs en hemocitos fueron altos cuando *C. gigas* fue expuesto a bacterias gram negativas (HKVP), lipoproteína sintética (FSL-1) y LPS de *E. coli*. Reportes previos indican que los TLR de *C. gigas* muestran una organización estructural similar a otros invertebrados (Zhang *et al.*, 2013), por lo tanto, la alta especificidad y respuesta rápida soportan la idea de una respuesta inmune compleja en los bivalvos.

Los niveles de expresión de FREP mostraron que no responde de manera inmediata en branquias y manto infectado. En *C. gigas* solo se ha determinado los niveles de expresión de FREP en branquias, glándula digestiva y hemolinfa (Huang *et al.*, 2015). Hasta el momento no hay reporte de los niveles de expresión de FREP en manto y tampoco del efecto de la presencia de patógenos. Sin embargo, en *M. galloprovincialis*, la inoculación con LPS, *V. anguillarum* (Gram negativa) y *M. lysodeikticus* (Gram positiva), evidenciaron un incremento significativo en los niveles de expresión de FREP en hemocitos a las 24 h posteriores al estímulo (Romero *et al.*, 2011).

Por otra parte, en hemocitos de *Agropectum irradians* expuestos a la bacteria Gram negativa, *Listonella anguillarum*, se observó un incremento gradual en los niveles de expresión de FREP durante las primeras 9 h posteriores a la exposición, el pico máximo a las 9 h seguido de una disminución gradual a las 12 h y 24 h (Zhan *et al.*, 2009). En este trabajo no se observó un incremento gradual en los niveles de expresión de FREP en branquias y manto. El pico máximo observado fue a las 24 h para ambos tejidos.

La distribución de la familia de genes de IL-17 ha sido reportada en branquias, glándula digestiva y manto de adultos de *C. gigas* (Li *et al.*, 2014). Además, se encontró una alta expresión de IL-17-3 en hemocitos expuestos a LPS y a bacterias *V. alginolitycus* atenuadas

por calor (HKVA). Nuestros resultados no muestran una evidencia clara de la participación del IL-17-3 en branquias de organismos expuestos a *E. coli*.

Por otra parte, en manto, sí se observó incremento en los niveles de expresión tanto al inicio como al final del experimento. Los elevados niveles de expresión a las 48 h coinciden con la participación de IL-17 en respuesta a bacterias Gram positivas. Específicamente, IL-17-3 que mostró incremento en los niveles de expresión a las 24 h posteriores a la inoculación de LPS en hemocitos de *C. gigas* (Li *et al.*, 2014). Probablemente los altos niveles de expresión de IL-17-3 al tiempo 0 h, corresponden a un estímulo inicial causado por la inoculación de *E. coli*, sin embargo, la respuesta no se mantuvo. Es necesario realizar más ensayos para determinar la participación de otras IL-17, (1, 2, 4 y 6), las cuales participan ante infecciones de patógenos.

9. CONCLUSIONES

Se logró identificar la expresión de Dscam en las especies de *C. gigas*, *C. corteziensis* y *C. sikamea*. Los tejidos de manto, branquias y semilla (*C. sikamea*) sin evidencia de patógenos y con patógenos expresan Dscam.

La localización de Dscam por hibridación *in situ*, en tejidos de *C. gigas* y *C. corteziensis* infectados mostró que las branquias y el manto expresan Dscam de manera preferente, mientras que glándula digestiva, intestino y gónada, expresan en menor proporción expresión de Dscam. Esto podría estar asociado con la localización del patógeno y el nivel de infección.

El análisis de las secuencias de la región codificante de Dscam de tres especies del género *Crassostrea*, mostró una organización conservada, manteniendo una similitud en su arquitectura como se ha observado en algunos artrópodos.

La identificación de regiones conservadas de Dscam fueron determinantes para la generación de sondas y oligonucleótidos específicos para la cuantificación por qPCR. Por lo que es de gran utilidad para evaluaciones posteriores en especies de *Crassostrea*.

Los niveles de expresión elevados de Dscam en branquias infectadas con *P. marinus* y OsHV-1 indican que es un tejido blanco para evaluar los procesos infecciosos.

Las evidencias sugieren que la expresión de Dscam en manto podría estar influenciada por la afinidad del patógeno hacia este tejido.

La expresión de Dscam no se incrementa de manera inmediata, en branquias y manto de *C. gigas* infectados con *E. coli*, el pico de máxima expresión se observó a las 12 h en ambos tejidos.

Se observó un incremento gradual de 0 h a 12 h en la expresión de Dscam en manto. En este tejido los niveles de expresión de Dscam fueron mayores en comparación con branquias.

10. LITERATURA CITADA

Aguirre-Macedo, M.L., R. A. Simá-Álvarez, M. K. Román-Magaña, J. I. Güemez-Ricalde. 2007. Parasite survey of the Eastern oyster *Crassostrea virginica* in coastal lagoons of the southern Gulf of Mexico. *J Aquat Anim Health*. 19:270–279.

Allam, B., D. A. Raftos. 2015. Immune responses to infectious diseases in bivalves. *J Invertebr Pathol*. 131:121-136.

Allam, B., E. Pales Espinosa. 2016. Bivalve immunity and response to infections: Are we looking at the right place? *Fish Shellfish Immunol*. 53:4-12.

Armitage, S.A., R. Y. Freiburg, J. Kurtz, I. G. Bravo. 2012. The evolution of Dscam genes across the arthropods. *BMC Evol. Biol*. 13:12-53.

Arzul, I., T. Renault, A. Thébault, A. Gerard. 2002. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res*. 84:151-160.

Bachère, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. de Lorgeril, J. Garnier. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunol Rev*. 198:149-168.

Barbosa-Solomieu, V., L. Miossec, R. Vázquez-Juárez, F. Ascencio-Valle, T. Renault. 2004. Diagnosis of Ostreid herpesvirus 1 in fixed paraffin-embedded archival samples using PCR and in situ hybridisation. *J Virol Methods*. 119:65-72.

Barcia, R., J. M. Lopez-García, J. I. Ramos-Martínez. 1997. The 28S fraction of rRNA in molluscs display electrophoretic behavior different from that of mammal cells. *Byochem Mol Biol Int*. 42:1089-1092.

Brites, D., S. McTaggart, K. Morris, J. Anderson, K. Thomas, I. Colson, T. Fabbro, T. J. Little, D. Ebert, L. Du Pasquier. 2008. The Dscam homologue of the crustacean *Daphnia* is diversified by alternative splicing like in insects. *Mol Biol Evol*. 25:1429–1439.

Buchmann, K. 2014. Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals. *Front Immunol*. 5:1-8.

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

Cáceres-Martínez, J., R. Vásquez-Yeomans R. 2013. Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción. *Ciencia pesquera*. 21:5-48.

Cáceres-Martínez, J., L. H. Madero-López, G. Padilla-Lardizábal, R. Vásquez-Yeomans. 2016. Epizootiology of *Perkinsus marinus*, parasite of the pleasure oyster *Crassostrea corteziensis*, in the Pacific coast of Mexico. *J Invertebr Pathol*. 139:12-18.

Cajaraville M. P., Y. Robledo, M. Exteberria, I. Marigomez. 1995. Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes. *Cell Biology in Environmental Toxicology*. 29–55.

Casas, S. M., A. Villalba, K. S. Reece. 2002. Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Dis Aquat Organ*. 50:51–65.

Chaney, M.L., A. Y. Gracey. 2011. Mass mortality in Pacific oysters is associated with a specific gene expression signature: oyster mortality gene expression prediction. *Mol Ecol*. 20:2942–2954.

Chian, Yi-An, H. Y. Hung, C. W. Lee, Y. T. Huang, H. C. Wang. 2013. Shrimp Dscam and its cytoplasmic tail splicing activator serine/arginine (SR)-rich protein B52 were both induced after white spot syndrome virus challenge. *Fish Shellfish Immunol*. 34:209-219.

Chou, P. H., H. S. Chang, I. T. Chen, H. M. Lin, Y. M. Chen, H. L. Yang. 2009. The putative invertebrate adaptive immune protein *Litopenaeus vannamei* Dscam (LvDscam) is the first reported Dscam to lack a transmembrane domain and cytoplasmic tail. *Dev Comp Immunol*. 3:1258-1267.

Chou, P. H., H. S. Chang, I. T. Chen, C. W. Lee, H. Y. Hung, Han-Ching, K. C. Wang. 2011. *Penaeus monodon* Dscam (PmDscam) has a highly diverse cytoplasmic tail and is the first membrane-bound shrimp Dscam to be reported. *Fish Shellfish Immunol*. 30:1109-1123.

Daugherty, M.D., H. S. Malik. 2012. Rules of engagement: molecular insights from host-virus arms races. *Annu Rev Genet*. 46:677-700.

Davison, A. J., B. L. Trus, N. Cheng, A. C. Steven, M. S. Watson, C. Cunningham, R. M. Le Deuff, T. Renault. 2005. A novel class of herpesvirus with bivalve hosts. *J General Virology*. 86:41–53.

De Vico, G., F. Carella. 2012. Morphological features of the inflammatory response in molluscs. *Research in Veterinary Science*. 93:1109-1115.

Dégremont, L. 2013. Size and genotype affect resistance to mortality caused by OsHV-1 in *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*. 416:129-134.

De Lorgeril, J., R. Zenagui, R. D. Rosa, D. Piquemal, E. Bachère. 2011. Whole transcriptome profiling of successful immune response to *Vibrio* infections in the oyster *Crassostrea gigas* by digital gene expression analysis. *PloS One*. 6:23142.

Delhalle, S., J. C. Schmit, A. Chevigné. 2012. Phages and HIV-1: from display to interplay. *Int J Mol Sci*. 13:4727-4729.

Derolez, V., D. Soudant, A. Fiandrino, L. Cesmat, O. Serais. 2013. Impact of weather conditions on *Escherichia coli* accumulation in oysters of the Thau lagoon (the Mediterranean, France). *J Appl Microbiol*. 114:516-525.

Dickson, T.C., C. D. Mintz, D. L. Benson, S. R. J. Salton. 2002. Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. *J Cell Biol*. 157:1105–1112.

Dong, Y., H. E. Taylor, G. Dimopoulos. 2006. AgDscam, a hypervariabl immunoglobulin domain-containing receptor of the *anopheles gambiae* innate immune system/minúsculas. *PLoS Biology*. 4:1137-1146.

Du Pasquier. 2006. Germline and somatic diversification of immune recognition elements in Metazoa. *Immunology Letters*. 104:2-17.

Enríquez-Espinoza, J.L., J. M. Grijalvo-Chon, R. Castro-Longoria, J. Ramos-Paredes. 2010. *Perkinsus marinus* in *Crassostrea gigas* in the Gulf of California. *Dis Aquat Org*. 89:269-273.

Ertl, N. G., W. A. O'Connor, A. Papanicolaou, A. N. Wiegand, A. Elizur. 2016. Transcriptome Analysis of the Sydney Rock Oyster, *Saccostrea glomerata*: Insights into Molluscan Immunity. *Plos One*. 11:1:33.

Evans, O., P. Hick, R. Whittington. 2017. Detection of Ostreid herpesvirus-1 microvariants in heal thy *Crassostrea gigas* following disease events and their possible role as reservoirs of infection. *J Invertebr Pathol*. 148:20-33.

Escobedo-Fregoso, C., I. Arzul, N. Carrasco, J.N. Gutierrez-Rivera, R. Llera-Herrera, R. Vazquez-Juarez. 2013. Polymorphism at the ITS and NTS loci of *Perkinsus marinus* isolated from cultivated oyster *Crassostrea corteziensis* in Nayarit, Mexico and phylogentic

relationship to *P. marinus* along the Atlantic Coast. *Transboundary and Emerging Diseases*. 62:137-47.

Faisal, M., E. A. MacIntyre, K. G. Adham, B. D. Tall, M. H. Kothary, J. F. La Peyre. 1998. Evidence for the presence of protease inhibitors in eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) oysters. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 121:161-168.

Fisher, W.S., M. Tamplin. 1988. Environmental influence on activities and foreign- particle binding by hemocytes of American oyster *Crassostrea virginica*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 1309-1315.

Frank, S.A. 2000. Specific and non-specific defense against parasitic attack. *J Theor Biol*. 202:283-304.

Friedman, C. S., J. H. Beattie-Ralph, A. E. Ronald, P. Hedrick. 1991. Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture* 94:1-15

Garnier, M., Y. Lebruche, J. L. Nicolas. 2008. Molecular and phenotypic characterization of *Vibrio aestuarianus* subsp. *francensis* subsp. nov., a pathogen of the oyster *Crassostrea gigas*. *Syst Appl Microbiol*. 31:358-65

Green, T.J., A. Vergnes, C. Montagnani, J. De Lorgeril. 2016. Distinct immune responses of juvenile and adult oysters (*Crassostrea gigas*) to viral and bacterial infections. *Vet Res*. 47:72.

Gosling, E. 2015. *Marine bivalve molluscs*. WILEY Blackwell. Second Edition. United Kingdom. 1-537.

Gorbushin, A. M., N. V. Iakovleva. 2013. Dscam receptors from mollusca: multiple isoforms are lacking. *Fish Shellfish Immunol*. 34:1653-1654.

Gueguen, Y., J. P. Cadoret, D. Flament, C. Barreau-Romiguere, A. L. Girardot, J. Garnier, A. Hoareau, E. Bachere, J. M. Escoubas. 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* 303:139-145.

Gullian-Klanian, M., J. A. Herrera-Silveira, R. Rodríguez-Canul, L. Aguirre-Macedo. 2008. Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. *Dis Aquat Org*. 79:237-247.

Guo, X., Y. He, L. Zhang, C. Lelong, A. Jouaux. 2015. Immune and stress responses in oyster with insights on adaptation. *Fish Shellfish Immunol.* 46:107-119.

Gútiérrez-Rivera, J. N., G. F. Arcos-Ortega, A. Luna-González, M. C. Rodríguez-Jaramillo, E. T. Arechiga-Carvajal, R. Vázquez-Juárez. 2015. Differential expression of serine protease inhibitors 1 and 2 in *Crassostrea corteziensis* and *C. virginica* infected with *Perkinsus marinus*. *Dis Aquat Org.* 112:185-197.

Hattori, D., E. Demir, H. W. Kim, E. Viragh, S. L. Zipursky, B. J. Dickson. 2007. Dscam diversity is essential for neuronal wiring and self-recognition. *Nature.* 449:223–227.

He, Y., A. Jouaux, S. E. Ford, C. Lelong, P. Sourdain, M. Mathieu, X. Guo. 2015. Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusk. *Fish Shellfish Immunol.* 46:131-44.

Huang, B., L. Zhang, LiLi, X. Tang, G. Zhang. 2015. Highly diverse fibrinogen-related proteins in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 43:485-490.

Hung, HY., T. H. Ng, J. H. Lin, Y. A. Chiang, Y. C. Chuang, H. C. Han-Wang. 2013. Properties of *Litopenaeus vannamei* Dscam (LvDscam) isoforms related to specific pathogen recognition. *Fish Shellfish Immunol.* 35:1272-1281.

Jin, X. K., W. Li, M. H. Wu, X. Guo, S. Li, A. Q. Yu, Y. T. Zhu, L. He, Q. Wang. 2013. Immunoglobulin superfamily protein Dscam exhibited molecular diversity by alternative splicing in hemocytes of crustacean, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 35:900-909.

Kelemen, O., P. Convertini, Z. Zhang, Y. Wen, M. Shen, M. Falaleeva, S. Stamm. 2013. Function of alternative splicing. *Gene.* 514:1–30.

Kwan, T. N., C. J. Bolch. 2015. Genetic diversity of culturable *Vibrio* in an Australian blue mussel *Mytilus galloprovincialis* hatchery. *Dis Aquat Organ.* 17:37-46.

Li, J., Z. Zhang, Z. Xiang, Y. Tong, F. Qu, Z. Yu. 2014. Genomic characterization and expression analysis of five novel IL-17 genes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 40:455-465.

Li, W., X. Tang, Y. Chen, W. Sun, Y. Liu, Y. Gong, X. Wen, S. Li. 2017. Characterize a typically Dscam with alternative splicing in mud crab *Scylla paramamosain*. *Fish Shellfish Immunol.* 71:305-318.

Litman, G. W., L. J. Dishaw, J. P. Cannon, R. N. Haire, J. P. Rast. 2008. Alternative mechanisms of immune receptor diversity. *Curr Opin Immunol.* 19:526-34.

- Livak, K. J., T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-DDCT} method. *Methods*. 25:402-408.
- Martenot, C., A. Segarra, L. Baillon, N. Faury, M. Houssin, T. Renault. 2016. In situ localization and tissue distribution of ostreid herpesvirus 1 proteins in infected Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol*. 136:124-135.
- Mazón-Suástegui, J. M. 1996. Cultivo del ostión japonés *Crassostrea gigas*. En: Casas, V. y Ponce, D. G. (Eds.). Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur, México. 625-650.
- Ng, T. H., Y. A. Chiang, Y. C. Yeh, H. C. Wang. 2014. Review of Dscam-mediated immunity in shrimp and other arthropods. *Dev Comp Immunol*. 14:129-138.
- Park, J.W., K. Parisky, A. M. Celotto, R. A. Reenan, B. R. Graveley. 2004. Identification of alternative splicing regulators by RNA interference in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 101: 15974–15979.
- Pernet, F., F. Lagarde, N. Jeanneé, G. Daigle, J. Barret, P. Le Gall, C. Quere, E. R. Dórbcastel. 2014. Spatial and temporal dynamics of mass mortalities in oysters is influenced by energetic reserves and food quality. *PLoS ONE*. 9:e88469.
- Queiroga, F.R., R. T. Vianna, C. B. Vieira, N. D. Farias, P. M. Da Silva. 2015. Parasites infecting the cultured oyster *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) in Northeast Brazil. *Parasitology*. 142:756–766.
- Rhoads, A., K. F. Au. 2015. PacBio sequencing and its applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 13:278-89.
- Richard, H., M. H. Schulz, M. Sulta, A. Nurnberger, S. Schrinner, D. Balzereit, E. Dagand, A. Rasche, H. Lehrach, M. Vingron. 2010. Prediction of alternative isoforms from exon expression levels in RNA-Seq experiments. *Nucleic Acids Res*. 38:112.
- Romero, A., S. Dios, L. Poisa-Beiro, M. M. Costa, D. Posada, A. Figueras, B. Novoa. 2011. Individual sequence variability and functional activities of fibrinogen-related proteins (FREPs) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) suggest ancient and complex immune recognition models in invertebrates. *Dev Comp Immunol*. 35:334-44.
- Rowley, A. F., Powell A. 2014. Invertebrate Immune Systems—Specific, Quasi-Specific, or Nonspecific?. *Journal of Immunology*. 7209-7214.

Savin Amador, M. 2015. Estudio de la Interacción de larvas véliger de ostión *Crassostrea gigas* con una bacteria probiótica y otra patógena a través de ensayos *In vivo*. Tesis (Maestría en ciencias), La Paz, BCS. Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Schmucker, D., Chen. 2009. Dscam and DSCAM: complex genes in simple animals, complex animals yet simple genes. *Genes Dev.* 23:147-156.

Schmucker, D., J. C. Clemens, H. Shu, C. A. Worby, J. Xiao J, M. Muda, J. E. Dixon. 2000. *Drosophila* Dscam Is an Axon Guidance Receptor Exhibiting Extraordinary Molecular Diversity/minus. *Cell.* 101:671-684.

Scultz, H., C. M. Adema. 2017. Comparative immunogenomics of molluscs. *Dev Comp Immunol.* 75:3-15.

Schwarz, R. S., J. D. Evans. 2013. Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Dev Comp Immunol.* 40:300–310.

Segarra, A., N. Faury, J. F. Pépin, T. Renault. 2014. Transcriptomic study of 39 ostreid herpesvirus 1 genes during an experimental infection. *J Invertebr Pathol.* 119:5-11.

Shulenburg, H., C. Boehnisch, N. K. Michiels. 2007. How do invertebrates generate a highly specific innate immune response?. *Mol Immunol.* 44:3338–3344.

Schmid-Hempel, P. 2005. Natural insect host-parasite systems show immune priming and specificity: puzzles to be solved. *Bioessays* 27:1026–1034.

Sokolova, I. M. 2009. Apoptosis in molluscs immune defense. *Invertebrate Surv J.* 6:49-58.

Tall, B. D., J. F. La Peyre, J. D. Bier, M. D. Miliotis, D. E. Hanes, M. H. Kothary, D. B. Shan, M. Faisal. 1999. *Perkinsus marinus* extracellular protease modulates survival of *Vibrio vulnificus* in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. *Appl Environ Microbiol.* 65: 4261–4263.

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

Vasquez-Yeomans, R., J. Caceres-Martínez, A. Figueras-Huerta. 2004. Herpes-like virus associated with eroded gills of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Mexico. *J Shellfish Res.* 23:417-419.

Vega, C. L. A., V. C. Marín, P.O. Pacheco, C. G. Zúñiga. 2013. Preliminary assessment of small scale bacterial depuration of *Crassostrea gigas* and *Anadara* spp., Gulf of Nicoya, Costa Rica. *Rev. Mar. Cost.* 5:107-117.

Vega Corrales, L. A., C. Marín Vindas. 2014. Evaluation of *Escherichia coli* concentrations in *Crassostrea gigas* and seawater in two oyster growing areas in the Gulf of Nicoya, Costa Rica. *Rev Mar Cost* 6:155-160.

Wang, W., M. Li, L. Wang, H. Chen, Z. Liu, Z. Jia, L. Qiu, L. Song. 2017. The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol.* 67: 221-228.

Watson, F.L., R. Püttmann-Holgado, F. Thomas, D. L. Lamar, M. Hughes, M. Kondo. 2005. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science.* 309:1874-1878.

Watthanasurorot, A., P. Jiravanichpaisal, H. Liu, I. Söderhäll, K. Söderhäll. 2011. Bacteria-induced Dscam isoforms of the crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *PLoS Pathogens.* 7:1-14.

Webb, S.C., A. Fidler, T. Renault. 2007. Primers for PCR-based detection of ostreid herpes virus-1 (OsHV-1): Application in a survey of New Zealand molluscs. *Aquaculture.* 272:126–139.

Wojtowicz, W.M, J. J. Flanagan, L. S. Zirpusky, J. C. Clemens. 2004. Alternative splicing of *Drosophila* Dscam generates axon guidance receptors that exhibit isoform-specific homophilic binding. *Cell.* 118:619-633.

Xing-Kun, J., L. Wei-Wei, W. Min-Hao, G. Xiao-Nv, Li. Shuang, Y. Ai-Qing, Z. You-Ting, H. Lin, W. Qun. 2013. Immunoglobulin superfamily protein Dscam exhibited molecular diversity by alternative splicing in hemocytes of crustacean, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 35: 900-909.

Yamakawa, K., Y. K. Huot, M. A. Haendelt, R. Hubert, X. N. Chen, G. E. Lyons, J. R. Korenberg. 1998. DSCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. *Hum Mol Genet.* 7:227–237.

Yoshihara, Y., M. Kawasaki, A. Tani, A. Tamada, S. Nagata, H. Kagamiyama, K. Mori. 1994. BIG-1: a new TAG-1/F3-related member of the immunoglobulin superfamily with neurite outgrowth-promoting activity. *Neuron.* 13:415–426.

Zannella, C., F. Mosca, F. Mariani, G. Franci, V. Folliero, M. Galdiero, G. P. Tiscar, M.

Galdiero. 2017. Microbial Diseases of Bivalve Mollusks: Infections, Immunology and Antimicrobial Defense/minus. *Marine Drugs*. 15:182-218.

Zhang, H., L. Wang, L. Song, X. Song, B. Wang, C. Mu, Y. Zhang. 2009. A fibrinogen-related protein from bay scallop *Argopecten irradians* involved in innate immunity as pattern recognition receptor. *Fish Shellfish Immunol*. 26:56-64.

Zhang, L., Li Li, X. Guo, G. W. Litman, L. J. Dishaw, G. Zhang. 2015. Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Scientific Reports* 5:1-11.

Zhang, S.M., C. M. Adema, T. B. Kepler, E. S. Loker. 2004. Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science*. 305:251-254.

Zhang, Y., X. He, F. Yu, Z. Xiang, J. Li, K. L. Thorpe, Z. Yu. 2013. Characteristic and functional analysis of Toll-like receptors (TLRs) in the iophotrocozoan, *Crassostrea gigas*, reveals ancient origin of TLR-mediated innate immunity. *PLOS ONE*. 8:e76464.

Zipursky, S.L., J. R. Sanes. 2010. Chemoaffinity revisited: Dscams, protocadherins, and neural circuit assembly. *Cell*. 143:343:353.