



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

TESE DE DOUTORAMENTO

**ESTUDIO PROTEÓMICO DEL  
SISTEMA INMUNITARIO DE LA  
OSTRA PLANA *Ostrea edulis* Y  
SU INTERACCIÓN CON  
PARÁSITOS *Bonamia* spp.**

Nuria Rodríguez de la Ballina

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL  
PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN CIENCIAS  
MARIÑAS, TECNOLOXÍA E XESTIÓN (DO MAR)

SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANO 2018





**DECLARACIÓN DO AUTORA DA TESE**  
**Estudio proteómico del sistema inmunitario de la**  
**ostra plana *Ostrea edulis* y su interacción con**  
**parásitos *Bonamia* spp.**

Dna. Nuria Rodríguez de la Ballina

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De selo caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide coa versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.

*En Santiago de Compostela, a 10 de Xullo de 2018*

Asdo. Nuria Rodríguez de la Ballina





**AUTORIZACIÓN DOS DIRECTORES DA TESE**  
**Estudio proteómico del sistema inmunitario de la**  
**ostra plana *Ostrea edulis* y su interacción con**  
**parásitos *Bonamia* spp.**

D. Antonio Villalba García  
Dna. Asunción Cao Hermida  
D. Miguel Hermida Prieto

INFORMAN:

*De que a presente tese correspóndese co traballo realizado por Dna. Nuria Rodríguez de la Ballina, baixo a nosa dirección, e autorizamos a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como directores desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, a 10 de Xullo de 2018*

Asdo. Dr. Antonio Villalba García Asdo. Dra. Asunción Cao Hermida

Asdo. Dr. Miguel Hermida Prieto





**AUTORIZACIÓN DO TITOR DA TESE**  
**Estudio proteómico del sistema inmunitario de la**  
**ostra plana *Ostrea edulis* y su interacción con**  
**parásitos *Bonamia* spp.**

D. Carlos Pereira Dopazo

INFORMA:

*De que a presente memoria de tese correspóndese co traballo realizado por Dna. Nuria Rodríguez de la Ballina, baixo a miña titoría, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, a 10 de Xullo de 2018*

Asdo. D. Carlos Pereira Dopazo.





Durante el desarrollo del presente trabajo Nuria Rodríguez de la Ballina ha disfrutado de una beca de formación de personal investigador de la Xunta de Galicia (DOGA nº152, 10 de Agosto de 2010, 14.512-14.518).

La presente tesis doctoral ha sido desarrollada en el Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA), perteneciente a la Xunta de Galicia, a través del siguiente proyecto:

- Proyecto OYSTERECOVER: "Establishing the scientific bases and technical procedures and standards to recover the European flat oyster production through strategies to tackle the main constraint, Bonamiosis (Oysterecover)", financiado por la UE dentro del 7º Programa Marco de la Unión Europea. N° Ref: (FP7-SM3-2008-2-243583).

**oysterecover**





Parte de los resultados obtenidos en esta tesis han dado lugar a la publicación del siguiente artículo científico:

de la Ballina, N., Villalba, A., Cao, A., 2018. Proteomic profile of *Ostrea edulis* haemolymph in response to bonamiosis and identification of candidate proteins as resistance markers. Dis. Aquat. Organ. 128, 127–145. <https://doi.org/10.3354/dao03220>.

Los autores del trabajo declaran no tener conflicto de intereses.



A mi Lauris, porque detrás de  
cada pequeño éxito siempre estás  
tú.





## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido posible gracias a la ayuda y el apoyo de mucha gente.

Gracias a mis directores de tesis: Antonio Villalba, Asunción Cao y Miguel Hermida, por darme la oportunidad de sacar este trabajo adelante. Antonio gracias por el apoyo y por permitirme expandir horizontes, ya sea para realizar una estancia en el extranjero o para presentar resultados en diferentes congresos, he aprendido mucho. Asun gracias por el trabajo en equipo, la paciencia infinita y el apoyo durante todos estos años. Siempre he agradecido tu cercanía y confianza.

To David Raftos, thank you for hosting me in your lab at Macquarie University and to Sridevi Muralidharan for teaching me proteomic techniques. My short stay in Sydney was a really nice professional and personal experience.

Gracias al equipazo de patología, capaz de sacarte una sonrisa nada más entrar por la puerta por malo que sea el día; especialmente a Maribel y Elena; por crear un pequeño hogar en el laboratorio donde coger energía para continuar. A todos los compañeros que hicieron mis años en el CIMA más bonitos, en especial a Mariano, a Lourdes y a Viki, por una ayuda incondicional, da gusto trabajar con gente como vosotros. A Andrea por tu ayuda con el diagnóstico de ostras. A tantos viajes en coche hasta Santiago; Paula, Lola, Asun, Nieves, gracias por hacer la ida y vuelta al trabajo un ratito mucho más agradable. Y en general a todo el personal de CIMA por hacerme sentir una más.

Y como no, agradecer a la bonita gente de esta tierra de meigas, que hicieron de Santiago mi segunda casa y que me dejaron con una morriña y unas ganas permanentes de volver. Especialmente a mis gusis, a esa cantidad de rizos que enredan, por vivir con la sonrisa por bandera y la certeza de que todo mejora con una xuntanza. Shizu, Lula, Mar, Lau, Ana, Carmela, Eviña, Esteban y especialmente a mi compi de vida, Ana, porque juntas hicimos un idioma incomprensible al que no es fácil entrar pero del que es imposible salir. A todas

gracias por hacerme pasar los días entre abrazos, entre risas, enterrruas!

A mi gente de Asturias (que guapina yes) por estar siempre ahí a pesar de mis largas ausencias, y por las visitas que alegran el corazón. Es una suerte saber que, a pesar de los años (ya casi podemos contar décadas) y de los distintos caminos, seguimos estando. A mis personitas del sur tan presentes (por fortuna) en este periodo, porque es imposible no ver la parte buena de lo que sea con gente como vosotros, sobre todo a Juan y a Olga por un apoyo y un cariño sin límites; cada reencuentro es demasiado bueno y demasiado corto.

Gracias infinitas a las aletas y los kayaks (y obviamente a las personas que lo hicieron posible) que se cruzaron en mi vida mientras escribía esta tesis, por darme la energía necesaria para continuar y reforzarme la sonrisa y la ilusión. Especialmente a Fra por vivir conmigo la parte final (y probablemente peor) siempre con un optimismo y unas ganas contagiosas. Gracias por hacerlo todo más fácil y mucho más bonito.

A mis dos pilares, por hacer que no lo entienda sin vosotros. A mi Lauris por... ¿por dónde empiezo?, por la ayuda infinita, las horas al teléfono, las críticas aplastantes y los ataques de risa que vienen después, por creer en mí (no se sabe por qué) y por ser mi estrella polar. Sé que estarás tan feliz como yo de que por fin sea una realidad tu segunda tesis. Y a mi Guaje por ser mi compañero de juegos, bromas y travesuras desde que tengo memoria hasta hoy, por darme a Bego, Hugo y morita. Y al resto de la familia por los ánimos y alguna riña que no sobraba.

Y sobretodo esta tesis es gracias a lo más bonito que tengo, mamá, papá, gracias por darme alas y branquias pa recorrer el mundo, un hogar en la tierrina al que siempre quiero volver, y una ilusión descontrolada para vivirlo todo. No tengo vida pa agradeceros ese apoyo incondicional y esos abrazos que espantan miedos.

A todos: os quiero a rabiar. Graciñas!



## ABREVIATURAS

1DE	Electroforesis unidimensional	ATP	Adenosín trifosfato
2DE	Electroforesis bidimensional	AUH	Hidratasa metilglutaconil-CoA
$\alpha$ -CHCA	$\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico	AVNV	Virus de necrosis viral aguda
‡-GBP	‡-1,3-glucanos	BIR	Baculoviral IAP
ACh	Acetilcolina	BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineamiento local
AChE	Acetilcolinesterasa	BPI	Bactericida o proteína que aumentan la permeabilidad
ACN	Acetonitrilo	BRD	Enfermedad del anillo marrón
ADAMTS	Desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina	BVRA	Biliverdina reductasa A
AdK	Adenilato quinasa	BSA	Seroalbúmina bovina
ADN	Ácido desoxirribonucleico	bZIP	Proteínas básicas de cremallera de leucina
ADP	Adenosín difosfato	C1qDC	Contiene el dominio C1q
AdSS	Adenilosuccinato sintetasa	CA	Catecolamina
AIF	Factor inflamatorio de aloinjerto	CAT	Catalasa
AJDS	Síndrome aislado de juveniles de abalon	CCT	Chaperonina que contienen TCP1
AK	Arginina quinasa	CDK	Ciclina dependiente de quinasas
AMF	Agua de mar filtrada	C/EBP	CCAAT/potenciador de unión
AMP	Adenosin monofosfato	CEACAM	Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario
AMP <sub>c</sub>	Adenosina-3'-5'-monofosfato cíclico	CHAPS	(3 -(3-Colamidopropil)-dimetilamonio)-propanosulfonato)
AMP	Péptido antimicrobiano	ChAT	Colina acetiltransferasa
AR	Repeticiones de anquirina	CID	Disociación inducida por colisión
ARN	Ácido ribonucleico	CIMA	Centro de Investigaciones Mariñas
APMAP	Proteína del plasma de adipocitos asociada a membrana		
ASB	Dominios de repeticiones de Anquirina y SOCS box		

CNKSR	Potenciador de conector supresor de quinasa de Ras	ERK	Proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos	ERS	Estirpe Rossmore seleccionada
DA	Dopamina	ESI	Ionización por electrospray
DAG	Diacilglicerol	EST	Marcador de secuencia expresada
DAMP	Patrón molecular asociado a daño	ETD	Disociación de transferencia de electrones
DDC	Dopa decarboxilasa	FA	Ácido farnesoico
DIGE	Gel de electroforesis diferencial	FAMeT	Ácido farnesoico o-metiltransferasa
DRG	GTP reguladora de desarrollo	FASTA	Alineamiento rápida
DTT	Ditiotreitol	FcR	Receptores Fc
dsRNA	ARN de doble cadena sintético	FHOD3	Proteína 3 que contiene el dominio FH1/FH2
EBI	Instituto europeo de bioinformática	FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
ECD	Disociación de captura de electrones	FGRF	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos
EcSOD	Superóxido dismutasa extracelular	FMO	Monooxigenasas que contienen flavina
ECM	Matriz extracelular	fmtA	fumitremorgin A
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético	FREP	Proteína relacionada con fibrinógeno
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	FTICR	Resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier
EG	Estirpes gallegas	FWHM	Ancho completo a la mitad del máximo
EGS	Estirpe gallega seleccionada	G	Granulocitos
EGNS	Estirpe gallega no seleccionada	GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
eIF4A	Factor de iniciación eucariótico	GAD	Ácido glutámico descarboxilasa
EF1- $\alpha$	Factor elongación 1 $\alpha$	GleN	Glucosamina
ELH	Hormona ponedora de huevos		
EN	Epinefrina		
ENK	Encefalina		

GlcNAc	† -1,4 N-acetilglucosamina	HSPG	Proteína del núcleo específico de la membrana basal de heparán sulfato proteoglicano
(GlcNAc) <sub>2</sub>	N,N'-diacetylquitobiasa		
GlcNAcT	N-acetilglucosaminidasa † -1,6-N-acetilglucosaminil transferasa	HSP	Proteína de choque térmico
GltS	Glutamato sintasa	HTCA	Hormona adrenocorticotrófica
GMBP	Proteína de unión a bacterias Gram- negativas	HtrA2	Serina proteasa mitocondrial
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina	IAP	Inhibidor de apoptosis
GO	Ontología génica	ICAT	Marcaje de afinidad codificado por isótopos
GPS	Servidor global de proteína	ICES	Consejo Internacional para la explotación del Mar
GPx	Glutación Peroxidasa	IEF	Isoelectrofoque
GS	Glutamina sintetasa	IFN	Interferón
GST	Glutación S-Transferasa	I-κB	Inhibidor de κB
GTP	Guanosín trifosfato	IKK	Quinasa I-κ
H2A	Histona 2A	IL	Interleuquina
H	Hialinocitos	IMD	Inmunodeficiencia
HCOOH	Ácido fórmico	IMP	Inosina monofosfato
HIP	Proteína que interactúa con Huntingtin	IL-R	Receptor de interleuquinas
HIF	Factor inducible de hipoxia	IPG	Gradiente de pH inmovilizado
HKMT	Histona-lisina metiltransferasa	IPN	Isopenicilina N
HMGB	High mobility group box	IRF	Factor regulador de interferón
hnRNP	Ribonucleoproteína heterogénea nuclear	iTRAQ	Marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia	IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
HSC	Proteína cognada de choque térmico	IT	Trampa iónica
		ITS	Espacio interno transcrito
		ISH	Hibridación <i>in situ</i>
		JAK	Quinasa Janus

JAK-STAT	Quinasa Janus-Transductor de señales y activador de la transcripción	MATH	Homología Traf asociada a meprina
JNK	Quinasas C-Jun N-terminal	MBL	Lectina de unión a manosa
KLHL	Proteínas Kelch	MDP	Dipéptido muramilo
La	Lupus Antígeno	MeOH	Metanol
LBP	Proteínas de unión al LPS	MEGF	Factor de crecimiento epidérmico múltiple
LC	Cromatografía líquida	MF	Metil farnesoato
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	MMIF	Factor inhibidor de migración de macrófagos
LDLR	Receptores de lipoproteínas de baja densidad	MMP	Proteína metaloproteínasa de matriz
LDR	Lipoproteínas de baja densidad	MORF4	Factor de mortalidad 4
LGBP	Proteína de unión a LPS y $\gamma$ -1,3-glucanos	MPO	Mieloperoxidasa
LITAF	Factor de transcripción inducido por LPS	MS	Espectrometría de masas simple
LPS	Lipopolisacárido	MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
LRR	Repeticiones ricas en leucina	MT	Metalotioneína
LTA	Ácido lipoteicoico	m/z	Masa/carga
MAC	Complejo de ataque de membrana	NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
mAChR	Receptor de ACh muscarínico	NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidrogenasa
MACPF	Moléculas formadoras de poros	NCBI	Centro Nacional de Información biotecnológica
MALDI	Desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz	NCP	Complejo de poros nucleares
MALT1	Translocación de la proteína 1 del linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas	NE	Norepinefrina
MAO	Monoaminoxidasa	NEI	Inmunomodulación neuroendocrina
MAPK	Proteína quinasa activadas por mitógenos	NF- $\kappa$ t	Factores nucleares kappa- $\kappa$
MAS	Solución Alsever Modificada	NIA	Eje inmunomodulador neuroendocrino

NO	Óxido nítrico	PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
NOS	Óxido nítrico sintetasa	PKA	Proteína quinasa A
nrdB	Base de datos de proteínas no redundantes	PKC	Proteína quinasa C
nrNCBI	no redundantes NCBI	PLC	Fosfolipasa C
OIE	Oficina internacional de epizootias	PLC $\gamma$ 1	Fosfolipasa C gamma 1
OMT	O-metiltransferasa	PLP	Fosfato de piridoxal
ONOO <sup>-</sup>	Peroxidonitrato	PLRP	Proteína relacionada con lipasa pancreática
OsHV-1	Herpesvirus de ostra tipo 1	PM	Peso molecular
p38	Proteína quinasa activadas por mitógeno p38	PMF	Huella de masas peptídicas
PAH	Fenilalanina hidroxilasa	PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos	PNP	Piridoxina 5 fosfato
PAR	Radiación fotosintéticamente activa	PNPO	Piridoxina-5'-fosfato oxidasa
PARP	Poli [ADP-ribosa] polimerasa	PO	Fenoloxidasa
PCD	Muerte celular programada	Poly I:C	Ácido Poliinosínico: policitídico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	POMC	Pro-opiomelanocorticoide
PFF	Huella de fragmento peptídicas	ppA	Enzima activadora de la proPO
PGN	Peptidoglicano	PPA2	Proteína fosfatasa 2A
PGRP	Proteína de reconocimiento de peptidoglicano	PPP	Vía de las pentosas fosfato
PI	Inhibidores de proteasas	PRRs	Patrones de reconocimiento de receptores
pI	Punto isoeléctrico	PTM	Modificación postraducciona
PIPasa	Prolina Iminopeptidasa	Q	Ubiquinona
PhK	Fosforilasa quinasa	QH <sub>2</sub>	Quinol
PI	Fosfoinositol	QPX	Parasito desconocido quahog
		Ras	Pequeñas GTPasas
		RhoGDI	Inhibidores de disociación Rho GDP

RLRs	Helicasas ARN similar a gen-1 inducible de ácido retinoico (RIG)	TEF	Factor de elongación de transcripción
RNS	Especies reactivas de nitrógeno	TEP	Proteín que contiene tioéster
ROR	Receptor transmembrana tirosina quinasa	TEMED	Tetrametiletilendiamina
ROS	Especies reactivas de oxígeno	TFN	Factor de necrosis tumoral
SAM	S-adenosil-metionina	TGF	Factor de crecimiento transformante
SAV	Vegetación acuática sumergida	TIMP	Inhibidor de metaloproteinasas de tejidos
SDH	Succinato deshidrogenasa	TIR	Receptor intracelular interleucina-1/ Toll
SDS	Dodecil sulfato sódico	TKT	Transcetolasa
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	TNF	Factor de necrosis tumoral
SETD2	Dominio SET que contiene proteína 2	TLR	Receptor tipo Toll
SGMP	Proteína similar a cemento	TOF	Tiempo de vuelo
sHSP	Proteína de choque térmico pequeña	TRAF	Factor asociado a receptores de TNF
SILAC	Marcaje isotópico estable con aminoácidos en cultivos celulares	TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF
SOD	Superóxido dismutasa	TRIM	Motivos tripartitos
SOCS	Supresoras de señalización de citoquinas	Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
SR	Receptor "scavengers"	Trx	Tiorredoxina
SRS	Stock Rossmore Seleccionado	Ub	Ubiquitina
STAT	Activadores de factores de transcripción	vWFA	Factor A de von Willebrand
SYNJ	Synaptojanin	WNT	Sitio integrado relacionado con Wingless
TAP	Cromatografía de afinidad	WSS	Síndrome del punto blanco
TCP-1	Proteína del complejo T-1	WSSV	Virus responsable del síndrome del punto blanco
		YHV	Virus de cabeza amarilla

# Índice

1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Contexto Ambiental.....	1
1.1.2 <i>Ostrea edulis</i> (Linnaeus, 1758).....	3
1.1.3 Importancia ecológica de las comunidades de ostras.....	8
1.1.4 Estado actual de las comunidades de ostra .....	11
1.1.5 Contexto histórico del declive de <i>Ostrea edulis</i> .....	16
1.2 SISTEMA INMUNE DE MOLUSCOS BIVALVOS.....	17
1.2.1 Factores celulares: los hemocitos.....	19
1.2.1.1 Respuesta inflamatoria .....	20
1.2.1.2 Fagocitosis .....	20
1.2.1.3 Agregación.....	22
1.2.1.4 Encapsulación.....	23
1.2.1.5 Producción de especies reactivas de oxígenos (ROS) y nitrógeno (RNS).....	25
1.2.2 Reconocimiento inmune: Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) .....	27
1.2.2.1 PRRs extracelulares .....	28
1.2.2.1.1 Proteínas que contienen el dominio C1q (C1qDC).....	29
1.2.2.1.2 Proteínas de unión a bacterias Gram- negativas (GNBPs).....	30
1.2.2.1.3 Lectinas tipo C .....	31
1.2.2.1.4 Galectinas .....	32
1.2.2.1.5 Proteínas relacionadas con Fibrinógeno (FREPs).....	33
1.2.2.1.6 Proteínas relacionadas con apextrin.....	34
1.2.2.2 Sistema del complemento .....	34
1.2.2.2.1 Proteínas que contienen tioéster (TEPs).....	37

1.2.2.2 Moléculas formadoras de poros (MACPF) .....	38
1.2.2.3 PRRs de membrana y cascadas de señalización .....	38
1.2.2.3.1 Receptores tipo Toll y vía de señalización.....	39
1.2.2.3.2 Proteínas de reconocimiento de Peptidoglicano (PGRPs) .....	40
1.2.2.3.3 Receptores “scavengers” (SRs).....	41
1.2.2.4 PRRs citosólicas.....	42
1.2.2.4.1 Helicasas ARN similares a gen-1 inducible de ácido retinoico (RLRs) y señalización.....	42
1.2.3 Vías de señalización .....	42
1.2.3.1 Vía NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa- $\kappa$ ) .....	43
1.2.3.2 Vía MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos).....	44
1.2.3.3 Vía JAK-STAT (quinasas Janus - Transductor de señales y activador de la transcripción).....	45
1.2.4 Factores humorales (Secreción de moléculas efectoras inmunes) .....	46
1.2.4.1 Péptidos antimicrobianos (AMPs) .....	46
1.2.4.2 Lisozimas .....	48
1.2.4.3 Integrinas.....	49
1.2.4.4 Citoquinas .....	49
1.2.4.5 Lectinas .....	52
1.2.4.6 Enzimas antioxidantes.....	54
1.2.4.6.1 Superóxido Dismutasa (SOD).....	55
1.2.4.6.2 Catalasa (CAT).....	56
1.2.4.6.3 Glutación Peroxidasa (GPx) .....	56
1.2.4.6.4 Glutación S-Transferasa (GST) .....	57
1.2.4.7 Metalotioneínas (MTs).....	57
1.2.4.8 Proteínas de choque térmico (HSPs).....	58
1.2.4.9 Péptidos bioactivos.....	60
1.2.4.10 Profenoloxidasa (proPO).....	61



1.2.4.11	Proteínas plasmáticas principales .....	62
1.2.4.12	Histonas .....	62
1.2.4.13	Inhibidor de metaloproteinasas de tejidos (TIMP).....	63
1.2.4.14	Quitinasa .....	63
1.2.4.15	Proteasas e inhibidores de proteasas.....	64
1.2.4.16	Proteínas plasmáticas relacionadas con Fe <sup>+2</sup> .....	64
1.2.4.17	Bactericidas o proteínas que aumentan la permeabilidad (BPIs).....	65
1.2.5	Procesos celulares con especial importancia en el sistema inmune .....	65
1.2.5.1	Muerte celular programada (PCD) .....	65
1.2.5.2	Apoptosis .....	66
1.2.5.3	Necrosis .....	67
1.2.5.4	Autofagia .....	68
1.2.6	Inmunomodulación neuroendocrina (NEI) .....	68
1.2.6.1	Inmunomodulación catecolaminérgica .....	69
1.2.6.2	Inmunomodulación colinérgica .....	70
1.2.6.3	Inmunorregulación del sistema nítrico oxidasa .....	71
1.2.6.4	Inmunorregulación de neuropéptidos .....	71
1.2.6.5	Inmunorregulación GABAérgica.....	72
1.3	PROTEÓMICA .....	74
1.3.1	Proteínas, proteoma y proteómica .....	74
1.3.2	Técnicas proteómicas .....	78
1.3.3	Herramientas de separación en proteómica .....	79
1.3.3.1	Electroforesis bidimensional 2-DE.....	79
1.3.3.1.1	Primera dimensión o Isoelectroenfoco (IEF).....	80

1.3.3.1.2 Segunda dimensión o SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS).....	81
1.3.3.1.3 Procedimientos de tinción .....	82
1.3.3.2 Gel de electroforesis de dos dimensiones diferencial (2D-DIGE) .....	86
1.3.3.3 Shotgun .....	87
1.3.4 Espectrometría de Masas (MS).....	89
1.3.4.1 Fuente de ionización .....	90
1.3.4.1.1 Desorción / ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI):.....	90
1.3.4.1.2 Ionización por electrospray (ESI): .....	90
1.3.4.2 Analizador de masas .....	91
1.3.4.3 Fragmentación.....	91
1.3.4.4 Detector .....	92
1.3.4.5 Procesador .....	92
1.3.5 Preparación de la muestra para MS .....	92
1.3.6 Identificación de proteínas.....	93
1.3.6.1 Huella peptídica (PMF).....	93
1.3.6.2 Espectrometría de masas en tándem.....	93
1.3.6.2.1 Identificación mediante huella de fragmentos peptídicos (PFF) .....	95
1.3.6.2.2 Secuenciación de novo .....	96
1.3.7 Electroforesis bidimensional y espectrometría de masas .....	96
1.3.8 <i>Shotgun</i> y espectrometría de masas .....	98
1.3.9 Búsqueda en bases de datos.....	100
1.3.10 Aplicaciones de estudios proteómicas en moluscos .....	103
1.3.11 Genómica funcional y proteómica.....	106

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	107
3 COMPARACIÓN DEL PROTEOMA DE LA HEMOLINFA ENTRE OSTRAS ( <i>Ostrea edulis</i> ) AFECTADAS POR BONAMIOSIS Y OSTRAS NO AFECTADAS.....	111
3.1 Introducción.....	111
3.1.1 Bonamiosis.....	111
3.1.2 Taxonomía.....	113
3.1.3 <i>Bonamia ostreae</i> .....	114
3.1.3.1 Distribución geográfica de <i>Bonamia ostreae</i> .....	115
3.1.3.2 Rango de hospedador de <i>Bonamia ostreae</i> .....	117
3.1.4 <i>Bonamia exitiosa</i> .....	117
3.1.4.1 Distribución geográfica y rango de hospedador de <i>B. exitiosa</i> .....	118
3.1.5 Ciclo de vida y transmisión de <i>Bonamia</i> spp.....	120
3.1.6 Interacción parásito - hospedador .....	121
3.1.7 Técnicas de diagnóstico de <i>Bonamia</i> spp.....	127
3.1.8 Control de la bonamiosis.....	129
3.2 Material Y Métodos.....	134
3.2.1 Estirpes de ostra utilizadas .....	134
3.2.2 Obtención de muestras de hemolinfa .....	136
3.2.3 Diagnóstico por PCR .....	137
3.2.4 Extracción proteica.....	139
3.2.5 Electroforesis bidimensional 2-DE .....	140
3.2.6 Análisis de imagen y comparativa entre geles .....	142
3.2.7 Espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos.....	145

3.3 Resultados .....	147
3.3.1 Comparación entre los grupos de hemolinfa de cada estirpe .....	147
3.3.1.1 Estirpe gallega seleccionada .....	147
3.3.1.2 Estirpe gallega no seleccionada .....	150
3.3.1.3 Estirpe Rossmore Seleccionada .....	153
3.3.2. Comparación entre estirpes en la distribución del número de marcas proteicas dependiendo del diagnóstico por PCR .....	156
3.3.3 Comparación entre los grupos de ostras sin infección de las estirpes gallegas .....	156
3.3.4 Identificación proteica .....	158
3.4 Discusión.....	167
4 ESTUDIO PROTEÓMICO DE GRANULOCITOS E HIALINOCITOS DE <i>Ostrea edulis</i> MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL .....	177
4.1 Introducción .....	177
4.1.1 Tipos hemocitarios de <i>Ostrea edulis</i> .....	177
4.1.2 Diferencias funcionales entre haliocitos y granulocitos .....	182
4.1.3 Objetivos.....	188
4.2 Material Y Métodos .....	188
4.2.1 Material biológico.....	188
4.2.2 Obtención de muestras de hemolinfa.....	188
4.2.3 Separación hemocitaria.....	189
4.2.4 Observación de la morfología de los hemocitos.....	190
4.2.5 Extracción proteica .....	191

4.2.6 Electroforesis bidimensional 2-DE .....	191
4.2.7 Análisis de imagen y comparativa entre geles .....	192
4.2.8 Espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos .....	193
4.3 Resultados.....	193
4.3.1 Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de <i>Ostrea edulis</i> mediante electroforesis bidimensional.....	193
4.3.1.1 Identificación proteica .....	195
4.3.1.1.1 Granulocitos.....	195
4.3.1.1.2 Hialinocitos.....	196
4.4 Discusión .....	202
4.4.1 Proteínas identificadas implicadas en vías de señalización.....	205
4.4.2 Proteínas identificadas implicadas en apoptosis .....	212
4.4.3 Proteínas identificadas implicadas en procesos redox ...	215
4.4.4 Proteínas identificadas implicadas en citoesqueleto .....	219
4.4.5 Proteínas identificadas implicadas en digestión.....	222
4.4.6. Proteínas identificadas implicadas en otras funciones.....	223
5 COMPARACIÓN DEL PROTEOMA DE GRANULOCITOS E HIALINOCITOS DE <i>Ostrea edulis</i> MEDIANTE EL PROCEDIMIENTO DE “SHOTGUN” .....	227
5.1 Introducción.....	227
5.1.1 Técnicas 2-DE y "Shotgun": Estudios proteómicos complementarios.....	227
5.1.2 Uso de proteómica "shotgun" en moluscos.....	229
5.1.3. Objetivos .....	230

5.2 Material Y Métodos .....	230
5.2.1 Preparación de muestras y digestión con tripsina.....	231
5.2.2 Análisis de espectrometría de massas e identificación proteica.....	232
5.2.3 Búsqueda de proteínas homólogas y análisis GO.....	233
5.3 Resultados .....	234
5.3.1 Identificación proteica mediante Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC- MALDI/MS) .....	234
5.3.2 Resultados del análisis GO .....	234
5.3.3 Identificación de proteínas exclusivas de granulocitos e hialinocitos implicadas en la respuesta inmune.....	240
5.4 Discusión.....	244
5.4.1 Proteínas identificadas implicadas en transducción de señales .....	247
5.4.2 Proteínas identificadas implicadas en apoptosis.....	256
5.4.3 Proteínas identificadas implicadas en reconocimiento...	261
5.4.4 Proteínas identificadas implicadas en procesos redox....	265
5.4.5 Proteínas identificadas implicadas en citoesqueleto.....	268
5.4.6. Proteínas identificadas implicadas en otras funciones inmunes.....	271
 6 COMPARACIÓN DEL PROTEOMA DE GRANULOCITOS E HIALINOCITOS DE <i>Ostrea edulis</i> AL ENFRENTARLOS "IN VITRO" A INDUCTORES DE RESPUESTA INMUNE.....	 273
6.1 Introducción .....	273
6.1.1 Lipopolisacáridos (LPS) .....	274

6.1.2	Ácido Poliinosínico: policitidílico (Poly I:C)	276
6.1.3	Zymosan A	277
6.1.4.	Objetivos	278
6.2	Material Y Métodos	278
6.2.1	Material biológico	278
6.2.2	Obtención de muestras de hemolinfa	279
6.2.3	Separación hemocitaria y observación de la morfología de los hemocitos	279
6.2.4	Enfrentamiento hemocitario a inductores de respuesta inmune	279
6.2.4.1	Lipopolisacáridos (LPS)	280
6.2.4.2	Ácido Poliinosínico: policitidílico (Poly I:C)	280
6.2.4.3	Zymosan A	280
6.2.5	Extracción proteica	282
6.2.6	Electroforesis bidimensional 2-DE	282
6.2.7	Análisis de imagen y comparativa entre geles	283
6.2.8	Espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos	285
6.3	Resultados	285
6.3.1	Estudio del efecto del enfrentamiento a LPS en el proteoma de granulocitos e hialinocitos de <i>Ostrea edulis</i>	285
6.3.2	Estudio del efecto del enfrentamiento a Poly I:C en el proteoma de granulocitos e hialinocitos de <i>Ostrea edulis</i>	288
6.3.3	Estudio del efecto del enfrentamiento a Zymosan A en el proteoma de granulocitos e hialinocitos de <i>Ostrea edulis</i>	294
6.3.3	Identificación proteica	301

6.4	Discusión.....	308
6.4.1	Pruebas con el inductor de respuesta inmune LPS .....	309
6.4.2	Pruebas con el inductor de respuesta inmune Poly I:C.....	310
6.4.3	Pruebas con el inductor de respuesta inmune ZymosanA .....	316
7	DISCUSION GENERAL.....	319
7.1	Proteínas relacionadas con apoptosis.....	319
7.2	proteínas implicadas en vías de señalización.....	322
7.3	Proteínas relacionadas con procesos redox.....	324
7.4	Proteínas relacionadas con el citoesqueleto .....	327
7.5	Proteínas implicadas en transcripción, traducción y degradación proteica.....	330
7.6	Proteínas implicadas en metabolismo energético .....	331
7.7	Proteínas implicadas en reconocimiento.....	333
7.8	proteínas implicadas en otras funciones inmunes .....	334
7.9	Comparación del proteoma entre Granulocitos e Hialinocitos de <i>O. edulis</i> .....	335
8	CONCLUSIONES .....	339
9	BIBLIOGRAFÍA .....	341



# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 CONTEXTO AMBIENTAL

En el litoral marino conviven gran cantidad de organismos que establecen relaciones a través de diversos procesos, constituyendo los distintos eslabones de redes tróficas, patrones de relaciones, de comportamiento, etc. Estos organismos son potenciales hospedadores de distintas especies de parásitos, lo que implica, una alteración y un aumento en la complejidad de estas relaciones (Huxham *et al.*, 1995; Lafferty *et al.*, 2006; Dunne *et al.*, 2013).

Los invertebrados marinos constituyen el mayor grupo de especies macroscópicas del mar (Ruppert *et al.*, 2004). El Filo Mollusca es uno de los grupos más grandes, variados e importantes dentro del reino Animal, solo superado en número por los Artrópodos (Zhang, 2013). Dentro de los Molluscos, la Clase Bivalvos es la segunda con mayor diversidad, después de los Gasterópodos, con alrededor de 7.500 especies, muchas de las cuales tienen gran importancia no sólo ecológica sino también a nivel comercial. Los Bivalvos como organismos sedentarios y filtradores, están expuesto a un ambiente en continuo enfrentamiento con bacterias, especialmente los géneros *Nocardia* y *Vibrio*; virus herpes y entéricos; protozoos patógenos, entre los que destacan los géneros *Bonamia*, *Marteilia*, *Haplosporidium* y *Perkinsus* (Venier *et al.*, 2011); pesticidas, aguas residuales, metales tóxicos, derivados del petróleo y demás contaminantes, de manera que a lo largo de la evolución estos organismos han desarrollado una gran variedad de estrategias efectivas para protegerse del ataque de patógenos y del estrés ambiental, lo que les ha permitido obtener una elevada capacidad de adaptación a los diferentes ambientes en los que viven.

Los organismos bivalvos establecen una relación muy íntima no sólo entre ellos, sino también con las condiciones ecológicas de los

sitios que habitan, de manera que cambios sutiles en dichos ambientes pueden provocar graves alteraciones. Sus poblaciones naturales funcionan como hospedadoras de múltiples organismos patógenos (virus, bacterias, hongos, protistas y metazoos), cuya presencia es regulada eficazmente a niveles poblacional y comunitario en ambientes silvestres no provocando, salvo excepciones, impactos severos (Esch *et al.*, 1990; Esch & Fernández, 1993; Figueras & Villalba, 1988; Hudson *et al.*, 2002).

Los primeros estudios sobre patología en moluscos se centran en aquellos agentes asociados a grandes mortalidades en especies de interés comercial (Lauckner, 1983). Estas mortalidades se incrementaron notablemente a partir de la intensificación de la acuicultura, ya que las técnicas de cultivo implican altas concentraciones de individuos, lo que favorece el contagio, y modificación ambiental, como la elevación de la temperatura en criaderos, lo que favorece la proliferación y transmisión de patógenos oportunistas (Elston & Wilkinson, 1985; Le Deuff *et al.*, 1996; Gestal *et al.*, 2008). Además, tanto el cambio climático como la contaminación ambiental afectan de manera significativa la salud de los moluscos, pudiendo llegar a reducir la capacidad del sistema inmune de bivalvos y aumentar la susceptibilidad a enfermedades (Dyrynda *et al.*, 1998, 2000; Cherkasov *et al.*, 2007; Anestis *et al.*, 2008; Ivanina *et al.*, 2008). Desde finales de la década de los '60, el cultivo de moluscos bivalvos en Europa se ha visto afectado por varias epizootias causadas por virus, bacterias, hongos y protozoarios, siendo los miembros de este último grupo, los principales agentes causales de enfermedades. Parásitos protozoarios intracelulares han desarrollado estrategias sofisticadas para eludir los mecanismos de defensa del huésped y por lo tanto encontrar nichos únicos en los que pueden sobrevivir y establecer una infección exitosa. Dichas estrategias permanecen en gran parte desconocidas en las infecciones producidas en moluscos bivalvos marinos. En algunos casos las epidemias causadas por estos organismos se consideran la principal causa de la casi extinción de algunas especies (Marteil, 1976), como es el caso de la ostra plana europea, *Ostrea edulis*.

### 1.1.2 *Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758)

*Ostrea edulis* (Linnaeus, 1758) es un Molusco Bivalvo perteneciente a la Familia Ostreidae, a la que corresponden las ostras planas comerciales en Europa. Esta especie es autóctona de las costas europeas, donde se distribuye desde Noruega hasta Marruecos, incluyendo el Mar mediterráneo y el Mar Negro. Además se ha introducido en América del Norte, Australia y Japón.

Estos moluscos se asientan sobre fondos firmes en aguas costeras poco profundas desde el intermareal hasta una profundidad de unos 20 m. La ostra plana europea puede llegar a vivir 15 años, aunque lo normal es una longevidad de entre 5 y 10 años. Los individuos adultos llegan a medir unos 11 cm en su eje mayor. Son organismos sésiles que forman parte del bentos marino; como el resto de bivalvos presentan dos valvas asimétricas calcificadas, la que se adhiere al sustrato es considerada la valva izquierda y presenta una forma convexa, mientras que la superpuesta es considerada la valva derecha

Dominio:	Eukaryota
Reino:	Metazoa
Filo:	Mollusca
Clase:	Bivalvia
Subclase:	Pteriomorphia
Orden:	Ostreoida
Superfamilia:	Ostreoidea
Familia:	Ostreidae
Género:	<i>Ostrea</i>
Especie:	<i>Ostrea edulis</i>



Figura 1. Sistemática y morfología externa de *Ostrea edulis*.

y es plana (Figura 1). Ambas valvas están unidas por un músculo aductor y por una charnela; ésta posee un ligamento proteico y ligeramente calcificado que se encuentra sobre la línea media dorsal. La concha de *Ostrea edulis* tiene forma ovalada y varias funciones: actúa como esqueleto para la fijación de los músculos, protege contra depredadores y patógenos, y ayuda a mantener el barro y la arena fuera de la cavidad del manto. Su principal componente es el carbonato de calcio y se forma por la deposición de cristales de esta sal en una matriz orgánica constituida mayoritariamente por la proteína conquiolina (Gosling, 2003).

Los órganos internos están cubiertos por el manto (Figura 2), el cual está compuesto por tejido conjuntivo, músculos, vasos sanguíneos y nervios, además presenta a ambos lados un epitelio unicelular. En la parte anterior, el manto forma un capuchón cefálico que cubre los palpos labiales y la boca. El manto tiene principalmente funciones sensoriales, mecánicas y de protección. En *Crassostrea*

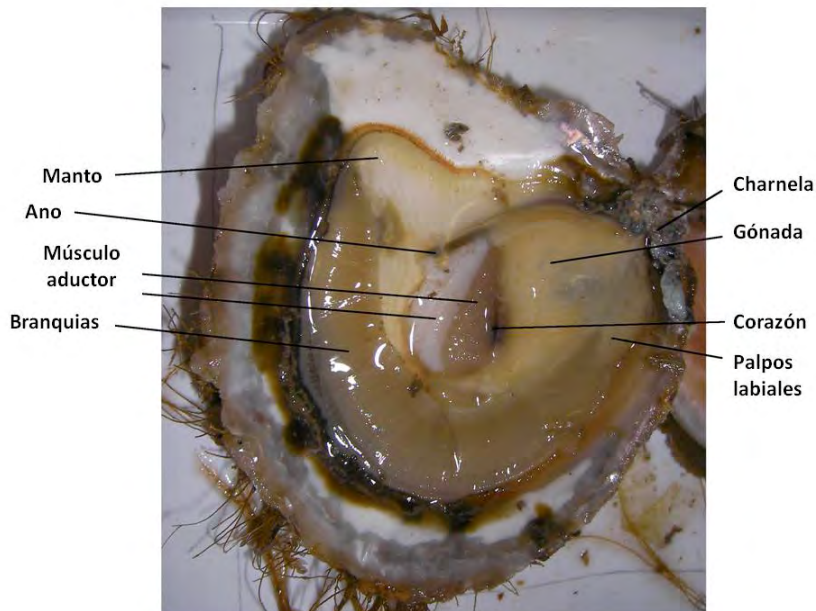


Figura 2. Anatomía de *Ostrea edulis*.

*gigas* se ha demostrado que el manto tiene también funciones como síntesis de proteínas, soporte intra y extracelular, transducción de señales, soporte metabólico, formación y calcificación de la concha (Miyamoto *et al.*, 2002).

El sistema digestivo está formado por boca, esófago, estómago, glándula digestiva, intestino, recto y ano. La boca es una abertura horizontal cubierta por los palpos labiales que llega al estómago atravesando el esófago. El estómago, de forma alargada, se encuentra inmerso en la glándula digestiva y continúa hacia el intestino. Paralelo al intestino y comunicado con éste se encuentra el saco (o bolsa) del estilo, donde se genera y aloja el estilo cristalino, estructura de textura gelatinosa donde se encuentran enzimas digestivas (amilasas, celulasas, quitinasas, lipasas, proteasas) (Alyakrinskaya, 2001). El intestino recorre un gran número de órganos, partiendo de la proximidad del corazón, para rodear la glándula digestiva hacia el recto y el ano, terminando a un costado del músculo aductor. Enzimas capaces de digerir grasas como estererasas, fosfatasas ácidas y alcalinas se han registrado en el estómago, glándula digestiva e intestino de *Ostrea edulis* (Mathers, 1973). El desplazamiento del alimento se lleva a cabo con la ayuda de cilios que recubren el epitelio interno del intestino. El sistema excretor está constituido por el riñón y la glándula pericárdica (Yonge, 1926; Gosling, 2003).

Las ostras se alimentan de partículas orgánicas en suspensión por filtración. Las branquias se extienden desde la boca hasta la proximidad del ano, presentan una doble función al encargarse de la alimentación y del intercambio gaseoso en el proceso de la respiración. Las branquias están constituidas por 4 láminas (lamelas branquiales) compuestas de filamentos branquiales, los cuales portan cilios anteriores y laterales, que provocan y dirigen la circulación del agua a través del órgano branquial, lo que supone un aporte continuo de oxígeno y partículas de alimento. La selección del alimento ocurre en las branquias, que secretan un mucopolisacárido al que se adhieren las partículas para ser dirigidas por los cilios hacia los palpos labiales antes de ser ingeridas (Ward *et al.*, 1994). Tanto en los palpos labiales como en las branquias se produce una selección de partículas, unas

son rechazadas y redirigidas hacia el exterior mientras que otras son admitidas y dirigidas hacia la boca; tanto los palpos labiales como las branquias se encargan de eliminar material en exceso, formando pseudoheces que se expulsan al exterior, impidiendo así la saturación de palpos y branquias (Yonge, 1926; Gosling, 2003).

El músculo aductor está situado en la región posterior del cuerpo y consiste en dos partes. Una de aproximadamente 2/3 del total del músculo, translúcida y de forma ovalada cuya función es motriz, y la otra, de menor tamaño, en forma de semiluna y de color blanco opaco. Las fibras musculares de esta porción son mucho más densas que en la porción traslúcida. La parte traslúcida puede contraerse rápidamente para cerrar las valvas por periodos cortos de tiempo, en cambio la parte opaca puede mantener cerradas las valvas por tiempos prolongados aunque su tiempo de reacción es más lento (Millman, 1964). La elasticidad y resistencia del ligamento de las valvas o charnela es de vital importancia para los movimientos de apertura y cierre. Se ha descrito en algunas especies de moluscos que la parte opaca y traslúcida están compuestas por células de músculo liso y estriado respectivamente (Matsuno & Kuga, 1989). El músculo aductor está rodeado por el corazón, branquias, intestino y ano.

Los bivalvos poseen un sistema circulatorio abierto en el que la hemolinfa es bombeada por el corazón y pasa a través de las arterias regando todos los órganos antes de regresar al corazón a través de los senos y venas (Gosling, 2003). El corazón se encuentra dentro de la cavidad del pericardio, situado entre la masa visceral y el músculo aductor.

El sistema nervioso en moluscos bivalvos está compuesto por ganglios cerebrales, viscerales y motores, organizados en varios pares de nervios. El sistema nervioso y la secreción de neurotransmisores/neurohormonas (serotonina y otros) controlan los movimientos de las branquias (Carroll & Catapane, 2007), los latidos del corazón (Kuwasawa & Hill, 1997), los movimientos del manto (Ram *et al.*, 1999), así como los procesos de maduración de las



gónadas y los mecanismos de desove (Siniscalchi *et al.*, 2004; Tanabe *et al.*, 2006).

La reproducción de *Ostrea edulis* está bien documentada, se trata de un organismo hermafrodita protándrico. Después de liberar espermatozoides, se convierte en hembra y continúa cambiando de sexo después de cada ciclo reproductivo, pudiendo solaparse el final de un ciclo con el comienzo del siguiente. Las ostras en fase masculina emiten el esperma a la columna de agua. Cuando se detecta esperma en el agua absorbida con las corrientes inhalantes por una hembra madura, los ovocitos se liberan a la cavidad del manto para su fertilización. Los embriones se retienen internamente alrededor de 7-10 días, hasta que las larvas han alcanzado la etapa veliger y son liberadas al agua, unos 10-16 días antes del asentamiento y la metamorfosis a ostras juveniles (Walne, 1964). La liberación de larvas tiene lugar de mayo a septiembre. El desarrollo larvario continúa en el plancton, etapa en la que tienen potencial de dispersión antes del asentamiento en el bentos. Las larvas usan cemento para la fijación; esta sustancia es segregada desde la glándula del biso y aplicada a la valva izquierda que queda unida al substrato. El cemento es un complejo de microfibras altamente organizado y es similar en composición a los hilos del biso de mejillones (Cranfield, 1975). Una vez instalados, las larvas sufren una serie de cambios morfológicos que permiten el paso de una vida pelágica a una existencia sésil. En el caso de *Ostrea edulis* en el proceso de metamorfosis hay una pérdida completa del pie (Gosling, 2003).

Los ciclos reproductivos de moluscos en general se encuentran regulados por factores endógenos y exógenos (Giese, 1959; Lubet & Mann, 1987). Dentro de los factores endógenos o internos se encuentran los neuroendocrinos y hormonales, los cuales controlan la acumulación de reservas energéticas y su movilización para el crecimiento somático y la gametogénesis (Mathieu & Lubet, 1993). Los factores exógenos o externos, como la temperatura, disponibilidad de alimento, salinidad, fotoperiodo, etc., controlan en la gametogénesis, los desoves y el desarrollo de larvas (Giese, 1959; Lubet & Mann, 1987). La reproducción de bivalvos es una respuesta

fisiológica a la compleja interacción de los factores endógenos y exógenos.

Los problemas patológicos asociados a *Ostrea edulis* son numerosos y de etiología diversa. Los principales organismos responsables de causar patologías en ostras planas europea son: la bacteria *Vibrio anguillarum* (Birkbeck *et al.*, 1987), el virus herpes de ostreidos tipo 1 (Comps & Cochenec 1993; Renault *et al.* 2000; Arzul *et al.* 2001; da Silva *et al.* 2009), los protozoos *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980), *Bonamia exitiosa* (Abollo *et al.*, 2008), *Marteilia refringens* (Montes *et al.*, 1998; Virvilis *et al.*, 2003), *Haplosporidium armoricanum* (van Banning, 1977; Azevedo *et al.*, 1999; Renault *et al.*, 2000), *Perkinsus mediterraneus* (Casas *et al.*, 2008, 2004) y *Mikrocytos* sp. (Bower & Rodgers, 2001; Gagné *et al.*, 2008) y los metazoos *Bucephalus haimeanus* (Lauckner, 1983) y *Ostracobable implexa* (Alderman, 1986).

Dentro de estos agentes etiológicos de diversas enfermedades, los organismos con más transcendencia ecológica y económica que amenazan la supervivencia de *Ostrea edulis* son los protozoos parásitos *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa*.

### **1.1.3 Importancia ecológica de las comunidades de ostras**

Aunque la gran mayoría de los estudios ecológicos realizados en ostras se han centrado en arrecifes de *Crassostrea* spp., muchos conceptos generales, que se detallan a continuación, pueden ser aplicados a los bancos de *O. edulis*.

Las ostras son "ingenieros del ecosistema", organismos que directa o indirectamente modulan la disponibilidad de recursos (que no sean ellos mismos) a otras especies al causar cambios en el estado físico de materiales bióticos o abióticos. Haciendo esto modifican, mantienen y/o crean hábitats (Jones *et al.*, 1994).

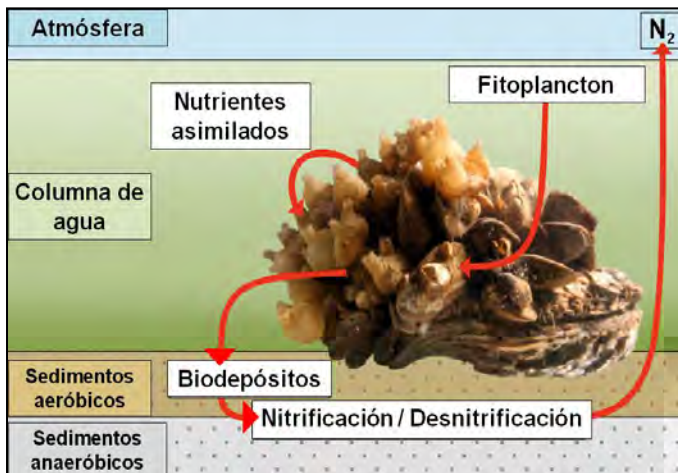
Estos bivalvos crecen verticalmente y en conjuntos densos que crean hábitats biogénicos ricos en moluscos, proporcionando un



sustrato duro que aumenta la biodiversidad y la producción de invertebrados epibentónicos, tales como poliquetos, crustáceos y otros invertebrados residentes (Wells, 1961; Bahr & Lanier, 1981; Lenihan *et al.*, 2001), además de, obviamente, la producción de ostras (Grabowski & Peterson, 2007). Dichos invertebrados son consumidos por peces y crustáceos móviles juveniles que utilizan los bancos de ostras como zona de búsqueda de alimento, de cría y refugio de depredadores, lo que conduce directa e indirectamente a través de la provisión de dichas especies, a un aumento de la transferencia de energía entre niveles tróficos que se traduce en un aumento en la producción de stocks pesqueros y otros organismos de gran importancia ecológica y económica (Coen *et al.*, 1998; Peterson *et al.*, 2003; Tolley & Volety, 2005). Por otro lado, los bancos de ostras son un importante componente del ecosistema que ayudan a diversificar el paisaje marino para mejorar los beneficios sinérgicos de varios tipos de hábitats, tales como la creación de corredores entre los refugios y las áreas de alimentación (Peterson *et al.*, 2003).

Las ostras son animales filtradores que se alimentan de fitoplacton y partículas en suspensión en la columna de agua. Debido al bombeo de una gran tasa de flujo de agua se les considera un biofiltro importante que ayuda a mantener el sistema en funcionamiento, ya que influyen en las propiedades del agua y en el ciclo de nutrientes (Newell, 1988; Grizzle *et al.*, 2006). En este sentido, tienen un papel fundamental en el ecosistema, siendo capaces de modificar los ciclos biogeoquímicos mediante la filtración de grandes cantidades de materia orgánica de la columna de agua que usan tanto en crecimiento y mantenimiento como en la generación de heces y pseudoheces que depositan en el sedimento (biodepósitos). Estos biodepósitos crean ambientes anaerobios, condiciones propicias para la eficiente eliminación de nitrógeno mediante desnitrificación microbiana (Newell *et al.*, 2002) (Figura 3). De manera que ayudan a contrarrestar aumentos en la carga de nitrógeno antropogénico y promueven una mayor producción de vegetación bentónica mediante fertilización con biodepósitos (Newell, 2004; Newell & Koch, 2004).

Como el resto de bivalvos, las ostras son capaces de secuestrar carbono de la columna de agua, ya que forman conchas de carbonato de calcio, actuando así como sumidero de carbono; de modo que los arrecifes de ostras contribuyen potencialmente a reducir las



**Figura 3.** Los arrecifes de ostras reducen la eutrofización mejorando la relación nitrificación/desnitrificación y asimilando nutrientes en macrofauna (Imagen adaptada de Kellogg *et al.* 2013).

concentraciones de gases del efecto invernadero (Peterson & Lipcius, 2003).

Por otro lado, la vegetación acuática sumergida (SAV), un hábitat ampliamente reconocido como crítico para muchas especies de peces e invertebrados (Thayer *et al.*, 1978), ha sufrido un declive en gran cantidad de comunidades debido principalmente al efecto adverso del enriquecimiento de nutrientes (eutrofización) antropogénico, lo que conlleva un aumento en la biomasa fitoplanctónica (blooms) y la correspondiente turbidez de la columna de agua, reduciendo así la radiación fotosintéticamente activa (PAR) por debajo del nivel requerido para el crecimiento de SAV (Twilley *et al.*, 1985). El filtrado realizado por las ostras incrementa la claridad de la columna de agua y con ello, la penetración de PAR de manera que la

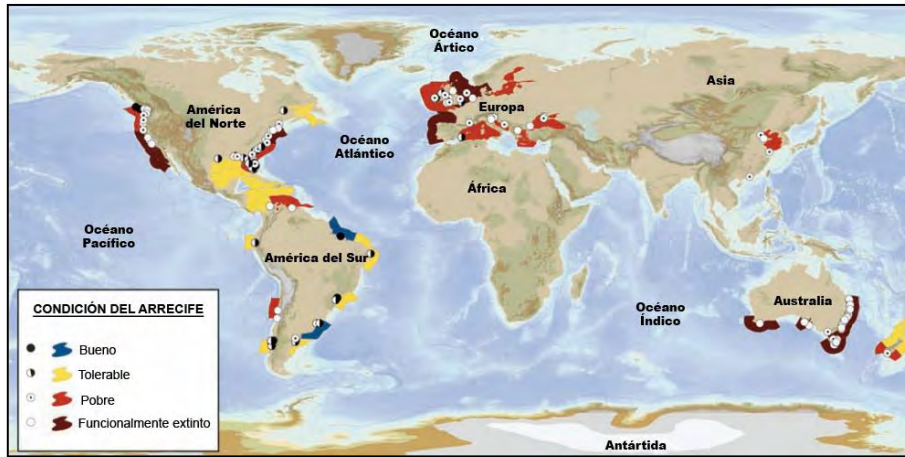
vegetación acuática sumergida puede llegar a restablecerse (Newell & Koch, 2004).

El conjunto de todos los servicios proporcionados por el ecosistema creado por estos moluscos le da al sistema una capacidad de tampón contra perturbaciones repentinas (DeAngelis, 1986; Jackson *et al.*, 2001; Lotze *et al.*, 2006), siendo capaces de reducir la proliferación excesiva del fitoplancton, contrarrestar los efectos de la eutrofización y, por tanto, mejorar la calidad de la columna de agua (Newell, 2004). Sin embargo, muchos bivalvos se han explotado gravemente mediante pesca excesiva, especialmente las ostras (Jackson *et al.*, 2001; Lotze *et al.*, 2006; Beck *et al.*, 2011). La eliminación de un organismo "clave" como este, puede alterar el ecosistema dramáticamente, dando lugar a cambios en procesos biológicos e inhibiendo efectos de eliminación de materia orgánica en suspensión, lo que predispone al ambiente a sufrir floraciones fitoplactónicas nocivas, hipoxia, brotes de enfermedades y otros síntomas propios del deterioro ambiental (Newell, 1988; Jackson *et al.*, 2001). Uno de los casos más documentados donde este fenómeno ha ocurrido es la bahía de Chesapeake (EE.UU.) (Newell, 1988; Jackson *et al.*, 2001; Lotze *et al.*, 2006).

En consecuencia, aumentar los bivalvos filtradores nativos, a través de la conservación y la restauración tiene potencial para restablecer todas las funciones servidas por los hábitats biogénicos que crean, mejorar la calidad del agua y controlar los sistemas donde las poblaciones naturales se han agotado (Jackson *et al.*, 2001).

#### **1.1.4 Estado actual de las comunidades de ostra**

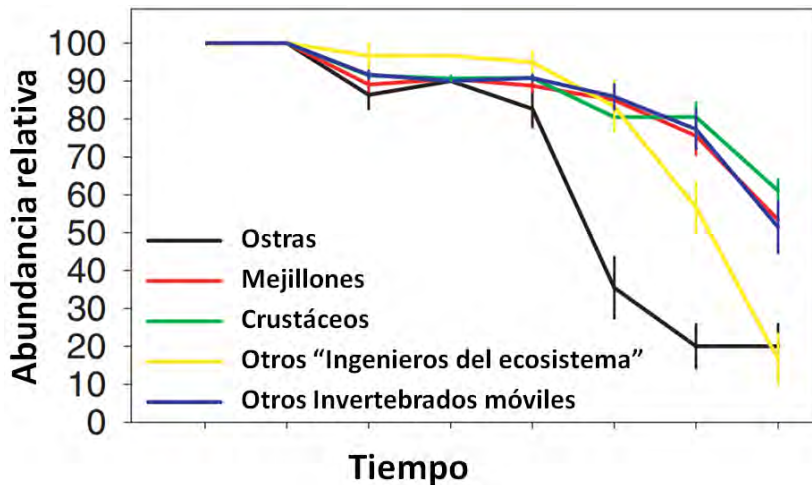
Desgraciadamente, los arrecifes y bancos de ostra forman uno de los hábitats estuáricos más degradados del mundo; aproximadamente el 85% del hábitat de arrecifes de ostras se ha perdido a nivel mundial durante los últimos 130 años (Lotze *et al.*, 2006; Beck *et al.*, 2011) (Figura 4).



**Figura 4.** Condición de los arrecifes de ostra a nivel mundial. Los rangos de condición corresponden al porcentaje de las ostras que permanecen en el arrecife en comparación con las que había en el pasado; siendo menos de un 50% perdido (Bueno), entre un 50% y un 85% (Tolerable), entre un 90% y un 99% (Pobre) y más de un 99% perdido (Funcionalmente extinto) (Imagen adaptada de Beck *et al.* 2011).

Un uso insostenible de este recurso natural ha resultado en la casi eliminación de las comunidades de ostras y los servicios que aportan al sistema. La causa principal de tal degradación se atribuye a la sobreexplotación sufrida, pero factores antropogénicos tales como alteraciones en las costas; cambios en los aportes de agua dulce; introducción de especies no nativas, aumentos en la carga de sedimentos, nutrientes, y toxinas también contribuyen a la disminución y destrucción de este valioso hábitat (Lotze *et al.*, 2006; Airoidi & Beck, 2007; Beck *et al.*, 2011).

Las ostras fueron los primeros invertebrados en sufrir un declive en sus poblaciones debido a su alto valor (son uno de los moluscos más valiosos a nivel económico en todo el mundo (Lafferty *et al.*, 2004)), a la gran accesibilidad de sus asentamientos y a los métodos



**Figura 5.** Gráfica que muestra el declive sufrido a lo largo de la historia en diferentes poblaciones de organismos invertebrados, donde se puede observar que las ostras han experimentado esta disminución antes que otros invertebrados (Figura adaptada de Lotze *et al.* 2006).

de explotación altamente destructivos, como recolección mecánica utilizando dragas y pinzas hidráulicas que eliminan del fondo marino todo tipo de organismos indiscriminadamente (Dayton *et al.*, 1995; Kirby, 2004) (Figura 5).

Estos bivalvos se han identificado como una especie amenazada; los arrecifes de ostras nativas deben ser reconocidos como un importante hábitat del ecosistema y una prioridad para la gestión del hábitat y la conservación. En concreto, las regiones con más de 90% del arrecife perdido son zonas críticas para la conservación, es el caso de la ostra plana (*Ostrea* spp.) de Europa, Australia y el Pacífico de América del Norte.

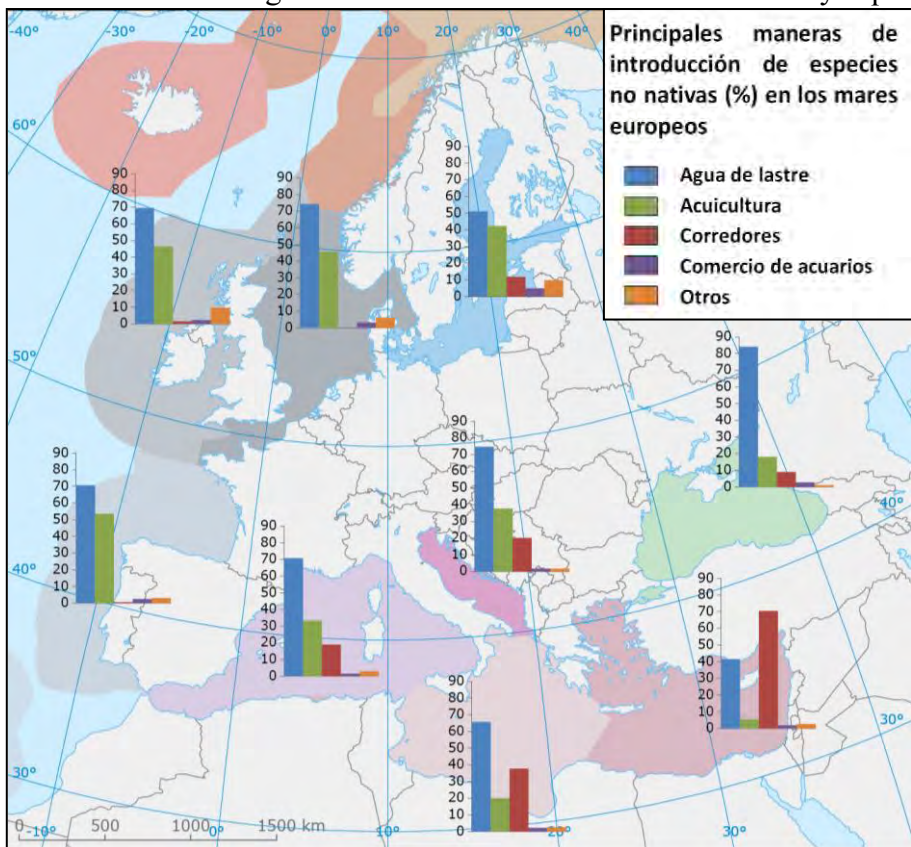
Las escasas poblaciones de ostras nativas salvajes *O. edulis* son uno de los hábitats marinos más amenazados de Europa (Airoldi & Beck, 2007), por lo que deben estar claramente identificadas y elevadas a un tipo de hábitat prioritario dado su extinción funcional en gran parte de Europa (Beck *et al.*, 2011). El desarrollo de cultivos de ostra plana contribuye a su mantenimiento. La acuicultura es considerada una opción en la restauración de los bancos naturales de ostra ya que puede evitar que se continúen explotando poblaciones salvajes y tiene gran experiencia en la producción de semilla y en el





crecimiento de ostras que se podrían utilizar en repoblación (Castilla *et al.*, 2007; Carranza *et al.*, 2009; Dumbauld *et al.*, 2009). Pero el cultivo de especies acuáticas tiene otros efectos adversos, entre los que cabe destacar la introducción de especies no nativas; la acuicultura es la segunda gran causa de introducción de especies invasoras después del agua de lastre (Molnar *et al.*, 2008) (Figura 6).

Las especies no indígenas son un componente cada vez más común de los sistemas estuáricos (Cohen, 1998). Estas especies introducidas tienen graves consecuencias en los ecosistemas ya que



**Figura 6.** Importancia relativa (%) de las principales vías de introducción de especies no indígenas a través de mares regionales de Europa en 2014. (Figura adaptada de <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/trends-in-marine-alien-species/assessment>).

son una fuente de enfermedades, competidores, predadores etc. (Ruesink *et al.*, 2005; Molnar *et al.*, 2008). Para minimizar los riesgos de la introducción de especies exóticas, el Consejo Internacional para la explotación del Mar (ICES) ha desarrollado un código con los procedimientos recomendados, que se actualiza periódicamente.

Los agentes patógenos y sus huéspedes evolucionan hacia la convivencia, de manera que los impactos de los patógenos nativos en los hospedadores nativos son necesariamente bajos (de lo contrario el patógeno eliminaría a su hospedador y se acabaría extinguiendo) (Price, 1980). Cuando una nueva combinación de huésped y patógeno surge, el hospedador puede tener resistencia innata a través de rasgos fisiológicos, o puede ser altamente susceptible al ataque de patógenos ya que la selección para la resistencia nunca se ha producido. Las ostras parecen mostrar un patrón similar al de muchas especies marinas, concretamente, con el aumento de la incidencia de brotes de enfermedades totalmente nuevas (emergentes) (Harvell *et al.*, 1999). Pero realmente, la introducción de un parásito en un nuevo entorno con nuevos huéspedes potenciales, tienen unas consecuencias impredecibles (Lafferty *et al.*, 2004).

### **1.1.5 Contexto histórico del declive de *Ostrea edulis***

*Ostrea edulis* llegó a formar grandes bancos naturales en las costas europeas, pero la sobrexplotación sufrida prácticamente lo agotó. En Europa las ostras se consideran un alimento muy popular desde hace siglos. Ya los antiguos griegos y romanos valoraban las ostras altamente; estos últimos pescaban e importaban ostras de todas las costas europeas, además las cultivaban extensamente (Günther, 1897). En algunos estuarios británicos hay signos arqueológicos de la sobrexplotación de los bancos de ostras nativas desde el primer siglo (Rippon, 2000). Durante siglos, los arrecifes de *Ostrea edulis* apoyaron una pesquería comercial productiva (MacKenzie, 1997). Debido a la grave explotación y al derroche en el uso de este recurso, a finales del siglo XIX, los bancos naturales de *O. edulis* estaban ya muy mermados o destruidos en la mayor parte de las costas de Europa (Ocean Studies Board 2004). La ostricultura de este molusco continuó



siendo de vital importancia tanto productiva como económicamente. Entre 1950 y 1960 Estados Unidos y Canadá realizaron importaciones sucesivas de ostra plana europea, posibilitando el asentamiento de poblaciones de esta especie alóctona en las costas este y oeste de Norteamérica (Carnegie & Barber, 2001; Marty *et al.*, 2006). Los franceses, en un intento de mejorar la genética de su industria ostrícola, importaron algunos reproductores de EE.UU. Estas importaciones tuvieron graves consecuencias al introducir en la zona al parásito *B. ostreae* (Cigarria & Elston, 1997; Elston *et al.*, 1986; Cochenec *et al.*, 2000), agravando con ello la delicada situación de los bancos naturales de *O. edulis*.

El cultivo de la ostra europea ha descendido drásticamente a lo largo de su historia, la causa principal de esta disminución en la producción atañe a las epidemias sufridas primero por el parásito *Marteilia refringens* (Grizel *et al.*, 1974) desde finales de la década de los 60 del siglo pasado y por *B. ostreae* (Pichot *et al.*, 1980) desde finales de la década de los 70. De modo que, tanto la sobreexplotación como los distintos procesos patológicos sufridos por *Ostrea edulis* suponen una alarmante amenaza para la supervivencia de esta especie. En la actualidad, la bonamiosis, enfermedad producida por protozoos del género *Bonamia* spp., supone el principal impedimento para la recuperación de los bancos naturales y de la ostricultura de la zona.

## 1.2 SISTEMA INMUNE DE MOLUSCOS BIVALVOS

El estudio del sistema inmune de los Bivalvos ha aumentado en los últimos años debido a la aparición de varias epidemias que amenazan la supervivencia de bivalvos cultivados. La producción de bivalvos, los informes sobre sus patógenos y las mortalidades asociadas a estos, han aumentado de manera considerable en las últimas décadas. Las altas densidades, el estrés o las frecuentes transferencias de bivalvos junto con virus, bacterias y parásitos son las principales causas de enfermedades de bivalvos (Gestal *et al.*, 2008).

A diferencia de los vertebrados, los bivalvos no poseen sistema inmune adaptativo, su defensa es esencialmente innata, basada en un

sistema no adquirido de reacciones inmunes (Loker *et al.*, 2004). Las barreras externas físico-químicas que poseen estos organismos tales como conchas, mucus con enzimas dotados de actividad bactericida y el epitelio, constituyen la primera línea defensiva contra patógenos y parásitos (Ratcliffe *et al.*, 1985; Glinski & Jarosz, 1997). Una vez superada ésta, es el sistema de defensa interno el que entra en juego. El sistema inmune innato, conservado en el reino animal (Hoffmann & Reichhart, 2002), es mediado por componentes celulares, encargados de la fagocitación y encapsulación que tienen como objetivo la destrucción de patógenos mediante actividad enzimática y liberación metabólica de oxígeno; y componentes humorales, donde hay una gran variedad de moléculas efectoras disueltas en el suero. Ambos procesos, celulares y humorales, trabajan de manera coordinada poniendo en marcha una amplia gama de respuestas inmunes que son de vital importancia para la protección del bivalvo (Cheng, 2000; Chu, 2000; Wang *et al.*, 2018).

Las respuestas inmunes comienzan a partir del reconocimiento inmune de estructuras conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que están presentes en la superficie de diferentes microorganismos. Dicho reconocimiento se lleva a cabo por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) codificados por la línea germinal. Con el reconocimiento de PAMPs, los PRRs activan vías de señalización intracelulares y desencadenan la síntesis de efectores antimicrobianos (Akira *et al.*, 2006). Por otro lado, procesos como la apoptosis y la autofagia son fundamentales en el sistema de defensa de las ostras (Hughes *et al.*, 2010; Moreau *et al.*, 2015). Recientemente, se ha descubierto en ostras una red reguladora neuroendocrina (NEI) que podría modular las respuestas inmunitarias mediante la liberación de varios neurotransmisores y hormonas (Liu *et al.*, 2016a).

En los últimos años se ha sugerido la existencia de transferencia inmune materna e inmune "priming" o estimulación de la respuesta inmune en ostras, demostrando que, por ejemplo, ostras *C. gigas* una vez inmunoestimuladas con bacterias o Poly I:C (ARN de cadena doble) son más resistentes a la infección bacteriana o vírica e incluso

son capaces de transmitir esa resistencia a la descendencia (Zhang *et al.*, 2014; Green *et al.*, 2016b; Li *et al.*, 2017).

Diversos estudios indican que los bivalvos, y concretamente las ostras, a lo largo de la evolución y la adaptación han alcanzado un sistema inmune altamente complejo con notables propiedades discriminatorias, que puede responder a diferentes patógenos y al estrés ambiental (Corporeau *et al.*, 2012; G. Zhang *et al.*, 2012; L. Zhang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018).

### 1.2.1 Factores celulares: los hemocitos

Los efectores principales del sistema inmune de los moluscos bivalvos son los hemocitos, los cuales constituyen los componentes celulares de la hemolinfa y juegan un papel central en las respuestas inmunes innatas. Estas células están implicadas en una gran variedad de procesos fisiológicos, como mecanismos de digestión, transporte de nutrientes y de excreción, procesos de reparación de la concha y sistema inmune; reconocimiento celular, quimiotaxis y agregación (Narain, 1973; Cheng, 1981; Hine, 1999; Mount *et al.*, 2004; Canesi *et al.*, 2002b; Matozzo *et al.*, 2007).

El empleo de técnicas de microscopía óptica y electrónica ha permitido realizar una clasificación de los hemocitos de moluscos en hialinocitos y granulocitos; los primeros poseen un citoplasma claro y prácticamente carente de gránulos, mientras que los segundos poseen granulaciones citoplasmáticas que pueden variar de escasas a muy abundantes (Cheng, 1981; Carballal *et al.*, 1997a; C López *et al.*, 1997b).

Los hemocitos de *Ostrea edulis* se han subdividido en granulocitos, hialinocitos grandes e hialinocitos pequeños (Xue *et al.*, 2000; Renault *et al.*, 2001; Comesaña *et al.*, 2012).

Dentro del sistema inmune, los hemocitos participan en respuestas inflamatorias, fagocitosis, encapsulación, agregación y liberación de radicales tóxicos frente a parásitos, patógenos y partículas ajenas; funciones imprescindibles para la supervivencia, especialmente en

organismos que se encuentran en un ambiente constantemente expuesto a microorganismos invasores potenciales y contaminantes, como es el caso de los invertebrados marinos.

#### 1.2.1.1 Respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria se define como el reclutamiento hemocitario y la extravasación de proteínas plasmáticas hacia el lugar de la infección (Abbas & Lichtman, 2000). Este mecanismo empieza tras una lesión tisular que en ocasiones se encuentra acompañada de la entrada de un agente extraño cuya naturaleza puede ser diversa (biológica, física o química). Este proceso, donde intervienen tanto componentes humorales como celulares, puede terminar con la destrucción del tejido dañado, el aislamiento del organismo invasor o la completa reparación del tejido (Feng, 1988). Los hemocitos juegan un papel protagonista en la reparación tisular que se lleva a cabo en varias etapas. Primero hay una migración de los hemocitos hasta el lugar de la herida, donde se forma un tapón tras la agregación hemocitaria; el tejido dañado se reemplaza mediante el traslado de los hemocitos desde el interior de la lesión hacia el sitio de la herida. A continuación se produce una deposición de colágeno por parte de los fibroblastos y se eliminan los restos celulares mediante la acción fagocítica de los granulocitos. Por último se reestructura la arquitectura tisular (Ruddell, 1971; Lauckner, 1983; Ratcliffe *et al.*, 1985; Fisher, 1986).

#### 1.2.1.2 Fagocitosis

La fagocitosis es un importante mecanismo de control y eliminación de cuerpos extraños, que consiste en la internalización física de microbios o restos celulares. Este mecanismo se ha conservado a lo largo de la evolución, dándose de manera universal en todo el reino animal desde protozoos hasta animales superiores (Fisher, 1986; Feng, 1988).

El proceso de la fagocitosis puede dividirse en varios pasos: 1) Quimiotaxis, atracción y migración hacia el cuerpo extraño; 2) Reconocimiento y unión al microorganismo invasor mediado principalmente por lectinas; 3) Internalización del microorganismo dentro del fagosoma; 4) Degradación del microorganismo mediante actividad microbicida (Cheng, 2000; Chu, 2000; Soudant *et al.*, 2013) (Figura 6). El reconocimiento de las partículas extrañas se produce a través de la interacción entre receptores del hemocito y diversos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Feng, 1988). En el proceso de adhesión juegan un papel primordial proteínas presentes en el suero, como aglutininas entre otras, que median la unión del agente extraño a la superficie celular de los hemocitos (Ratcliffe *et al.*, 1985). Tras el reconocimiento de la partícula no propia y su adhesión a la membrana del hemocito, ésta puede extenderse formando pseudópodos o producir una invaginación alrededor del agente extraño que resulta en la fagocitosis de la partícula extraña. La inhibición de la polimerización de actina reveló que el citoesqueleto juega un papel primordial en los procesos de internalización (Cheng & Howland, 1982).

El agente extraño se envuelve en una primera vesícula llamada fagosoma, las células fagocíticas poseen orgánulos llamados lisosomas que contienen una cantidad elevada de enzimas lisosomales tales como fosfatasas, hidrolasas, esterases y amidasas. Durante el proceso de fagocitosis los lisosomas se fusionan con el fagosoma primario formando el fagosoma secundario o fagolisosoma. Por último, hay una descarga de enzimas de degradación dentro de la vesícula comenzando así con la digestión y eliminación del patógeno intracelularmente (Carballal *et al.* 1997a; López *et al.* 1997; Canesi *et al.* 2002a; Donaghy *et al.* 2009a).

La destrucción del patógeno en el fagosoma puede realizarse mediante la actividad de las enzimas lisosómicas o por liberación de metabolitos tóxicos de oxígeno. Mediante técnicas histoquímicas se han demostrado las actividades de las enzimas fosfatasa ácida y alcalina, arilsulfatasa, lipasa, aminopeptidasa esterasa, peroxidasa, fenoloxidasa, liozima, N-acetil- $\gamma$ -hexosaminidasa, citocromo c

oxidasa y  $\beta$ -glucuronidasa en lisosomas de hemocitos de moluscos (López *et al.*, 1997c; Moore *et al.*, 1980; Xue & Renault, 2000; Cima *et al.*, 2000; Culloty *et al.*, 2002; Wootton *et al.*, 2003).

Tras la destrucción intracelular de un patógeno se forman gránulos de glucógeno que o bien son utilizados en procesos metabólicos del hemocito o bien se liberan al suero. En ocasiones las bacterias se pueden destruir en el medio extracelular utilizando enzimas y productos intracelulares que son liberados al plasma. La liberación de estas moléculas viene determinada por los procesos de degranulación donde la lisozima y otros productos acumulados en gránulos en el citoplasma se liberan al medio mediante procesos de exocitosis (Fisher, 1986).

#### 1.2.1.3 Agregación

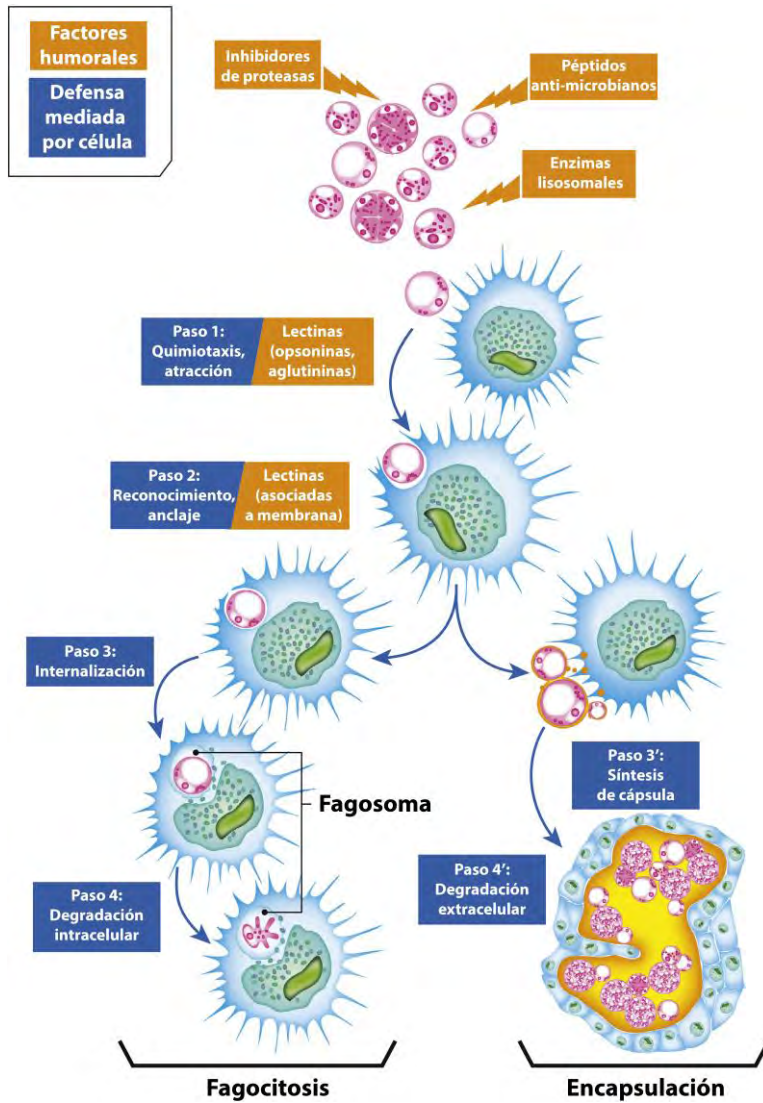
La agregación o formación de nódulos no es un proceso aislado, sino que aparece asociado a los mecanismos de fagocitosis. Suele ocurrir cuando la hemolinfa se encuentra invadida por un elevado número de agentes extraños y la fagocitosis por sí sola no puede eliminarlos (Ratcliffe *et al.*, 1985). Los hemocitos junto con otras células no fagocíticas se unen formando una maraña tisular donde quedan atrapadas las partículas no propias. El proceso termina con la eliminación del patógeno. Se cree que estos nódulos son capaces de combatir a los microorganismos mediante la inanición que sufren dentro de los propios agregados, la producción de la melanina y de sus precursores, altamente tóxicos, junto con la liberación de enzimas intracelulares como la lisozima (Ratcliffe *et al.*, 1985). Cuando un agente exógeno es capaz de superar las barreras de fagocitosis y agregación, los invertebrados ponen en marcha el proceso de encapsulación para paralizar la entrada de microorganismos (Feng, 1988; Fisher, 1986). Por tanto, las enzimas hidrolíticas participan en la destrucción y degradación de microorganismos tanto intra como extracelularmente, encontrándose en el extracto hemocitario y en el suero de la hemolinfa; su liberación está asociada a cambios fisiológicos, al estrés y a procesos inmunes (Cheng, 1986; López *et al.*, 1997c).

#### 1.2.1.4 Encapsulación

Cuando el microorganismo invasor es demasiado grande para ser fagocitado por un hemocito se produce la encapsulación del mismo, para ello varios hemocitos rodean al patógeno formando varias capas de células que producen un depósito de fibroblastos, de manera que aíslan y limitan el daño potencial del invasor (Chu, 2000). Se constituyen una serie de capas concéntricas donde las más internas están formadas por fibroblastos y residuos mucopolisacáridicos y las más externas están constituidas por materiales fibrosos formando un retículo en asociación con glicoproteínas. En el proceso de encapsulación el contenido del lisosoma es liberado sobre la superficie celular del patógeno (Figura 7) (Bayne, 1990; Bachère *et al.*, 1991).







**Figura 7.** Representación esquemática de los posibles mecanismos de defensa celular en bivalvos frente a microorganismos y parásitos. El proceso de fagocitosis se puede dividir en: (1) Quimiotaxis, atracción y migración hacia el cuerpo extraño (2) Reconocimiento y anclaje del agente extraño; (3) Internalización; y (4) Degradación intracelular. Los microorganismos también pueden ser encapsulados y degradados extracelularmente (3' y 4') (Imagen adaptada de Soudant *et al.* 2013).



### 1.2.1.5 Producción de especies reactivas de oxígenos (ROS) y nitrógeno (RNS)

Una vez que el patógeno es internalizado, se produce un aumento del consumo de oxígeno y de la estimulación de la NADPH oxidasa, enzima capaz de transferir electrones desde el NADPH al oxígeno molecular; este proceso es conocido como "estallido respiratorio". En este mecanismo de defensa se producen intermediarios conocidos como especies reactivas de oxígeno tóxicos (ROS) (Figura 8) que tienen un papel importante en la degradación de microorganismos invasores, funcionando como potentes efectores inmunológicos (Bachère *et al.*, 1991; Comesaña *et al.*, 2012). Las ROS pueden actuar por sí mismas o bien interaccionando con enzimas hidrolíticas liberadas en el proceso de fagocitosis (Adema *et al.*, 1991).

El anión superóxido ( $O_2^-$ ) es el primer metabolito formado mediante la NADPH oxidasa que se puede transformar espontáneamente o a través de la superóxido dismutasa (SOD) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Reeves *et al.*, 2003; Roos *et al.*, 2003).  $H_2O_2$  puede degradarse a oxígeno y agua en una reacción dependiente

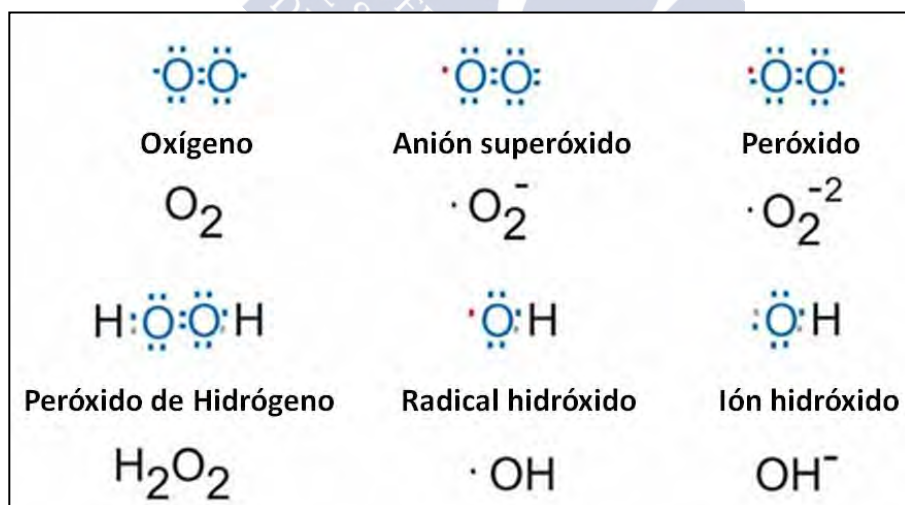
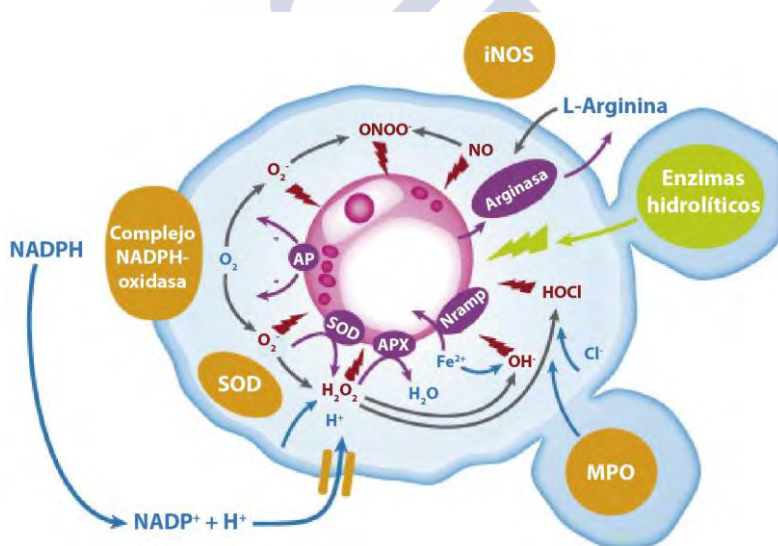


Figura 8. Estructura de electrones de los intermediarios reactivos de oxígeno más comunes.

de catalasa o se puede combinar con cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) para formar ácido hipoclorito en una reacción catalizada por mieloperoxidasa (MPO). Se ha demostrado la producción de  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  por los hemocitos de *Ostrea edulis* (Hervio *et al.*, 1989; Bachère *et al.*, 1991; Nakayama & Maruyama, 1998; Comesaña *et al.*, 2012) (Figura 9).

Por otro lado, la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) presente en los hemocitos de moluscos (Conte & Ottaviani, 1995) produce óxido nítrico (NO) que posteriormente puede transformarse en peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), ambas moléculas forman parte de las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Ischiropoulos *et al.*, 1992). NO es una importante molécula de señalización que presenta diversas funciones fisiológicas como vasodilatación, control de secreciones, relajación intestinal,



**Figura 9.** Vías metabólicas envueltas en la producción de las principales especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) en respuesta a un protozoo parásito (línea rosa), en el interior del fagosoma (línea azul) de los hemocitos de bivalvos. (NO: Óxido nítrico;  $\text{ONOO}^-$ : Peroxinitrito;  $\text{O}_2^-$ : Anión superóxido; HOCl: Hipoclorito; NOS: óxido nítrico sintasa inducible; SOD: Superóxido dismutasa; MPO: mieloperoxidasa; AP: fosfatasa ácida; APX; peroxidasa dependiente de ascorbato; NRAMP: proteínas de macrófagos asociada a resistencia natural) (Imagen adaptada de Soudant *et al.* 2013).

citotoxicidad, regulación de procesos de desarrollo, neurotransmisión y neuromodulación (Jacklet, 1997). Además, NO forma parte de la respuesta inmune innata y es sintetizado tras la infección por parásitos (Rivero, 2006). En organismos bivalvos, la fagocitosis estimula la producción de NO (Tafalla *et al.*, 2003), que tiene un papel importante en la eliminación de patógenos (James, 1995; Chakravorty & Hensel, 2003).

ROS y RNS muestran un amplio espectro de toxicidad siendo cruciales en la defensa del hospedador y en el buen funcionamiento de los hemocitos. Particularmente el radical hidróxido, peróxido de hidrógeno y el anión peroxinitrito poseen la mayor capacidad de desnaturalización proteica (Tiscar & Mosca, 2004). Como respuesta a estos mecanismos, muchos patógenos han desarrollado estrategias complejas que les permiten modular la generación de ROS y RNS, bloqueando así los mecanismos defensivos del hospedador (Volety & Chu, 1995; Dermine & Desjardins, 1999; Schott *et al.*, 2003; Müller, 2004; Ellis *et al.*, 2011). En el caso de *Ostrea edulis* es aceptado que *Bonamia* spp. es capaz de inhibir la producción de ROS hemocitaria (Hervio *et al.*, 1991; Comesaña *et al.*, 2012). Hervio *et al.* 1991 demostraron la presencia de actividad ácido fosfatasa en los haplosporosomas de *B. ostreae*, enzima capaz de inactivar la producción de NADPH oxidasa, y con ello la producción de ROS, en los hemocitos de la ostra plana europea (Morga *et al.*, 2009).

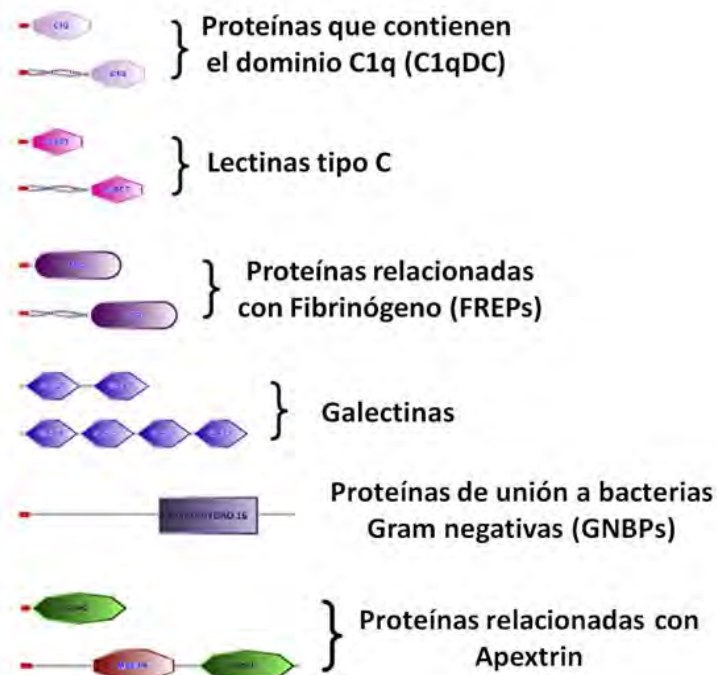
### **1.2.2 Reconocimiento inmune: Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)**

El reconocimiento inmune juega un papel de vital importancia en el sistema inmunológico al discriminar lo propio de sustancias no propias; paso esencial en la activación de una respuesta inmune coordinada y eficaz, sobre todo en organismos que carecen de inmunidad adaptativa. Así la estrategia general del sistema inmune innato incluye la detección de numerosos receptores dedicadas a reconocer moléculas microbianas y parasitarias que se conservan a lo largo de la evolución. Este reconocimiento temprano de patógenos es necesario para evitar la proliferación y difusión de patógenos, y

finalmente impedir la destrucción del hospedador. Se trata de un sistema capaz de reconocer estructuras comunes en los microorganismos, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*) (PAMPs) a través de receptores de reconocimiento de patrones (*Pattern recognition receptors*) (PRRs), moléculas del huésped que reconocen la infección microbiana (Janeway & Medzhitov, 2002; Medzhitov & Janeway, 2002). El sistema defensivo de invertebrados ha desarrollado un sofisticado sistema de PRRs, el resultado de distintas interacciones específicas proteína-proteína y modificaciones posteriores a la traducción, convierte la fase de detección en una expresión finamente ajustada de genes que proporcionan una variedad de moléculas efectoras (por ejemplo, péptidos antimicrobianos, receptores y moléculas de adhesión, proteasas e inhibidores de proteasas, citoquinas y quimioquinas) y formas de comportamiento de las células como puede ser migración, fagocitosis, autofagia, apoptosis. El éxito de esta estrategia de defensa depende de la presión del patógeno (cantidad y virulencia), la disponibilidad y la plasticidad funcional de PRRs, vías moleculares basados en cascadas enzimáticas y circuitos de regulación dentro y fuera de los hemocitos. La rapidez e intensidad de las reacciones de defensa innatas también están influenciados por la condición funcional del hospedador (Gerdol & Venier, 2015). PRRs son familias conservadas evolutivamente de moléculas extracelulares, de unión a la membrana o citosólicas, cuya función de reconocimiento microbiano se debe a un número limitado de dominios de proteínas (Pålsson-McDermott & O'Neill, 2007).

#### 1.2.2.1 PRRs extracelulares

PRRs secretadas se caracterizan por presentar diferentes dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) y posiblemente existen en cientos de variantes de proteínas. La Figura 10 muestra una representación de los distintos PRRs extracelulares de bivalvos.



**Figura 10.** Representación esquemática de los distintos PRRs extracelulares de bivalvos. El segmento rojo en el extremo N-terminal de las moléculas indica el péptido señal. Imagen adaptada de Gerdol & Venier 2015.

### 1.2.2.1.1 Proteínas que contienen el dominio C1q (C1qDC)

Las proteínas que contienen el dominio C1q (C1qDC) son una de las principales clases de PRRs en la mayoría de bivalvos (Gerdol *et al.*, 2015). La primera referencia de una fuerte sobreexpresión de secuencias C1qDC tras la inyección de bacterias en *Mytilus galloprovincialis* llegó en 2010 (Gestal *et al.*, 2010). Más tarde dicho estudio fue confirmado en distintas especies como en *Mytilus coruscus* (Liu *et al.*, 2014). En *Crassostrea virginica* se observaron diferencias en la expresión de varios C1qDC entre ostras

resistentes y susceptibles a la infección bacteriana responsable de la enfermedad juvenil de la ostra, *Roseovarius crassostrea* (McDowell *et al.*, 2014). C1qDC es una de las proteínas con mayor aumento en su expresión al enfrentar a *M. galloprovincialis* a bacterias (H. Wu *et al.*, 2013a).

La importancia de esta familia de genes se descubrió por la abundancia de las transcripciones de C1qDC en la primera colección de ESTs (marcadores de secuencia expresada) de mejillón (Venier *et al.*, 2011) y por la posterior identificación de 168 transcripciones de C1qDC diferentes. En algunos casos se observó un aumento en la expresión de C1qDC en hemocitos enfrentados con bacterias Gram- y Gram+ (Gerdol *et al.*, 2011). La familia de genes C1q ha sufrido una expansión masiva, se han identificado 1.274 posibles C1qDC en el genoma de *M. galloprovincialis* (Gerdol & Venier, 2015). Tal diversificación puede explicar el amplio espectro de patógenos reconocidos por el dominio C1q de moluscos bivalvos, incluyendo bacterias Gram- y Gram+, organismos como *Rickettsia* spp., hongos y parásitos (Gerdol & Venier, 2015).

#### 1.2.2.1.2 Proteínas de unión a bacterias Gram-negativas (GNBPs)

La familia GGBP incluye estructuras proteicas que se unen a bacterias Gram-negativas, concretamente a lipopolisacáridos (LPS) y  $\beta$ -1,3-Glucanos (Christophides *et al.*, 2002). GGBP activa la cascada de señalización tipo Toll en *Drosophila*, desencadenando melanización en respuesta a infecciones bacterianas Gram+ (Wang *et al.*, 2006). Las proteínas de unión a LPS y  $\beta$ -1,3-glucanos (LGBPs) son un tipo de GNBPs con diversas funciones biológicas, incluyendo la activación del sistema de la prophenoloxidasas (pro-PO), citólisis, agregación bacteriana y reacción de opsonización. Dicho grupo proteico se ha identificado en la vicira *C. farreri*, demostrando su papel defensivo frente a bacterias (Huan *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010). GNBPs de bivalvos con doble capacidad para unirse a  $\beta$ -1,3-glucanos ( $\beta$ -GBP), y LPS se han caracterizado en en ostras perliíferas *Pinctada fucata* (D. Zhang *et al.*, 2010). Una proteína de unión a  $\beta$ -



GBP se detectó en el mejillón *Perna viridis*, con una actividad de proteasa serínica inherente, comprobándose que aglutina levadura, bacterias y eritrocitos y aumenta la actividad plasmática de la profenoloxidasa (Jayaraj *et al.*, 2008). También se han identificado  $\zeta$ -GBPs en *C. gigas*, mostrando posibles lugares de unión a integrina y aumento de la actividad fenoloxidasa de los hemocitos, lo que sugiere que estas proteínas podrían haber evolucionado de manera diversa y poseer diferentes funciones inmunológicas (Itoh *et al.*, 2010). Tres posibles GNBPs se han identificado en el transcriptoma de *M. edulis* (Philipp *et al.*, 2012).

#### 1.2.2.1.3 Lectinas tipo C

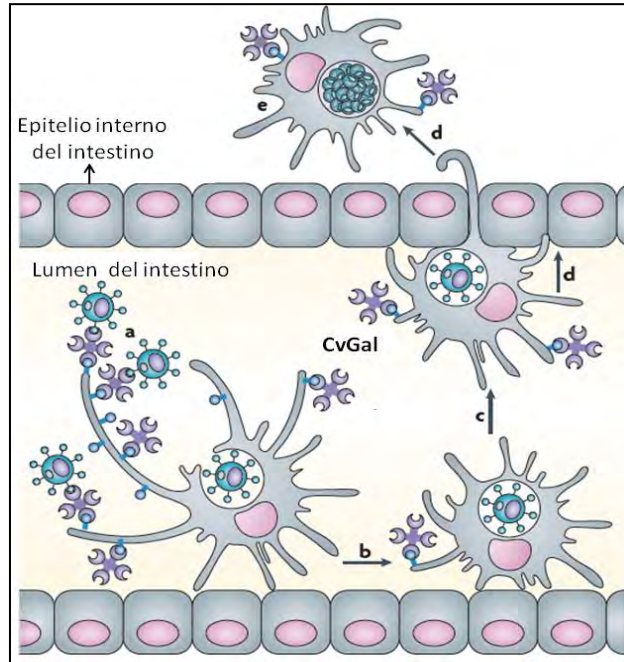
Las lectinas tipo C son una superfamilia de proteínas con uno o más dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRDs), de aproximadamente unos 130 aminoácidos, que se unen a los azúcares terminales en glicoproteínas y glicolípidos con el objetivo de reconocer agentes extraños o invasores (Zelensky & Greedy, 2005). Se han detectado lectinas tipo C asociadas a la aglutinación y la opsonización de patógenos o parásitos en diferentes bivalvos. En *C. virginica* se describieron varias lectinas, entre ellas se identificó una lectina tipo C implicada en la inmunidad de mucosas cuya expresión aumenta en procesos de ayuno o frente a la exposición bacteriana (Jing *et al.*, 2011). También en *C. gigas* se ha identificado una lectina tipo C (Yamaura *et al.*, 2008). Varias de estas lectinas se han descrito en *Argopecten irradians* con distintas propiedades de aglutinación de bacterias (Kong *et al.*, 2011; H. Zhang *et al.*, 2011). Hasta 5 lectinas tipo C diferentes se han identificado en *C. farreri* que contribuyen a la diferenciación de moléculas propias y ajenas del molusco por su interacción con varios PAMPs, además funcionan como opsoninas participando en la eliminación de patógenos (H. Wang *et al.*, 2007; J. Yang *et al.*, 2011b; Yang *et al.*, 2010; H. Zhang *et al.*, 2009a). En la almeja *Ruditapes philippinarum* también se ha identificado una lectina tipo C (Mu *et al.*, 2014). Un aumento en la expresión de lectina tipo C se ha documentado en los hemocitos de almejas infectadas por *Perkinsus olseni* (Kim *et al.*, 2008).

El gran número de lectinas tipo C encontradas en bivalvos comparten características estructurales similares y muestran actividad de unión y aglutinación hacia una amplia gama de microbios. La diversidad de las combinaciones de dominios lectina C en bivalvos es notable, comprende aproximadamente 350 genes en *C. gigas* (G. Zhang *et al.*, 2012), además se pueden asociar con otros dominios funcionales en proteínas de gran tamaño; con un análisis transcriptómico se ha confirmado dicha variedad en *M. galloprovincialis* y *C. gigas* (Gerdol & Venier, 2015). Puesto que no hay inmunidad mediada por anticuerpos en invertebrados, una amplia variedad de lectinas, con diversidad de perfiles de expresión y bioactividad, podría actuar como efectores indispensables en el sistema inmune de bivalvos (Song *et al.*, 2010).

#### 1.2.2.1.4 Galectinas

Galectinas son una familia de lectinas de unión específica a azúcares  $\beta$ -galactósido y son probablemente la familia más conservada y ubicua de lectinas que se encuentran en organismos multicelulares (Janeway & Medzhitov, 2002; Medzhitov & Janeway, 2002). En moluscos se caracterizan por dos o cuatro repeticiones en tándem de un dominio CRD galectina (Gerdol & Venier, 2015). Se han identificado galectinas en diferentes ostras, es el caso de *C. gigas* (Yamaura *et al.*, 2008), *C. virginica* donde se demostró que esta proteína reconoce varios microorganismos y algas, entre ellos al parásito *Perkinsus marinus*, y se observó que el anclaje de los hemocitos a superficies extrañas inducía la secreción de galectina, su localización en la periferia celular y su unión a la membrana plasmática, para posteriormente promover la fagocitosis (Figura 11) (Tasumi & Vasta, 2007; Vasta, 2009). También en la ostra perlífera *P. fucata*, donde tiene funciones en la respuesta inmune como proteína constitutiva y proteína de fase aguda (D. C. Zhang *et al.*, 2011). En el genoma de *C. gigas* se detectaron 14 genes galectina (G. Zhang *et al.*, 2012). Las galectinas actúan principalmente como PRRs pero también puede representar patrones moleculares asociado a daño (DAMPs), capaces de señalar el daño tisular asociado a patógenos (Sato *et al.*, 2009).





**Figura 11.** Reconocimiento de los trofozoítos de *Perkinsus marinus* por la ostra *Crassostrea virginica* mediante la galectina CvGal. CvGal es secretada por lo hemocitos y translocada a la periferia, donde se une a la superficie celular. Los trofozoítos de *P. marinus* son ingeridos por filtración y reconocidos por CvGal en la superficie de los hemocitos (a) que recubren el lumen del intestino; son fagocitados (b) y transportados a través del epitelio intestinal (c, d) al medio interno. El parásito evita la muerte dentro de los hemocitos del hospedador (inhibe los mecanismos del hemocito para matar y degradar microorganismos fagocitados) y prolifera (e), provocando de este modo la infección sistémica y eventualmente la muerte del hospedador. Imagen adaptada de Vasta 2009.

#### 1.2.2.1.5 Proteínas relacionadas con Fibrinógeno (FREPs)

Las proteínas relacionadas con fibrinógeno (FREPs) son lectinas con un dominio de tipo fibrinógeno C-terminal y con propiedades distintas a la coagulación como aglutinación, efectos antibacterianas, procesos de desarrollo, alorreconocimiento (Hanington & Zhang, 2011). En bivalvos, se ha identificado una FREP como PRR en vieiras

*A. irradians* fuertemente expresada al enfrentar el molusco a *Listonella anguillarum* (H. Zhang *et al.*, 2009b). También se identificaron FREPs en EST de *M. galloprovincialis* que se sobreexpresan en respuesta a infección y que muestran propiedades opsonicas (Gorbushin & Iakovleva, 2011; Romero *et al.*, 2011). Estos datos confirman la participación de FREPs en la inmunidad de bivalvos; en mejillón FREPs representan la tercera clase más abundante de moléculas similares a lectina secretadas, después de proteínas C1qDC y lectinas de tipo C (Gerdol & Venier, 2015). En el genoma de *C. gigas* se identificaron 199 genes FREPs (G. Zhang *et al.*, 2012).

#### 2.2.1.1.6 Proteínas relacionadas con apextrin

El dominio apextrin C-terminal se ha reconocido recientemente como un PRR nuevo en anfibios, puesto que se ha demostrado que dos proteínas relacionadas con apextrin actúan como sensores intra y extracelulares de peptidoglicano (PGN) y su componente dipéptido muramilo (MDP) (G. Huang *et al.*, 2014). Proteínas relacionadas con apextrin también están involucradas en el reconocimiento de patógenos y su inactivación en equinodermos (Dheilly *et al.*, 2011). La sobreexpresión de dos transcripciones de proteínas relacionadas con apextrin en respuesta a desafíos con bacterias se ha documentado en *M. galloprovincialis* (Estévez-Calvar *et al.*, 2011). Se podría predecir la presencia del dominio apextrin C-terminal (ApeC) en al menos 23 proteínas correspondientes al transcriptoma del mejillón mediterráneo y en 13 genes de ostras *C. gigas* (Gerdol & Venier, 2015). El descubrimiento de las propiedades PRR de proteínas relacionadas con apextrin es reciente y son necesarios datos funcionales adicionales para asociar definitivamente dichas proteínas a la respuesta inmune de bivalvos.

#### 1.2.2.2 Sistema del complemento

A pesar de un importante número de estudios, el conocimiento sobre los eventos que ocurren en cascada por la activación de los

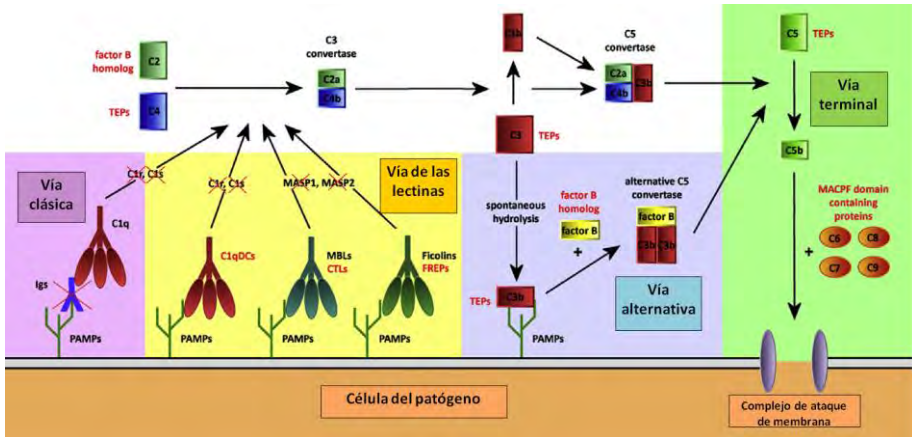
PRRs extracelulares en bivalvos es escasa. Aparte de GNBPs, que desencadenan la activación de la vía de señalización de los receptores tipo Toll, todas las principales familias PRR descritos en esta memoria potencialmente podrían converger en una vía inmune innata bien conocida en vertebrados, el sistema del complemento (Gerdol & Venier, 2015). El sistema del complemento es el principal sistema efector de la inmunidad innata (L. Li *et al.*, 2007). Las funciones mediadas por los productos de activación del complemento incluyen la opsonización, que conduce al aumento de la fagocitosis y la lisis de patógenos, la quimiotaxis celular, además de la solubilización de los complejos inmunes e inflamación (Boshra *et al.*, 2006). El sistema del complemento está formado por un conjunto de proteínas plasmáticas que se activan tras una estimulación por parte de microorganismos y promueven la destrucción de los mismos, así como los procesos de fagocitosis e inflamación (Abbas & Lichtman, 2000). La activación de este sistema se puede dar por medio de tres rutas diferentes: la vía clásica, la alternativa y la de las lectinas. En la primera de ellas, el sistema se activa por medio de los inmunocomplejos formados por la Inmunoglobulina G o M (IgG o IgM) unidos al antígeno, por lo que sólo se da en vertebrados. La vía alternativa, aunque se descubrió más tarde, es más primitiva filogenéticamente (Dodds & Matsushita, 2007); no requiere la presencia de anticuerpos para activarse sino que se inicia por medio del reconocimiento de PAMPs presentes en la superficie de microorganismos (Farries & Atkinson, 1991), mediante la acción de una proteína del suero conocida como C3 (Abbas & Lichtman, 2000). La tercera y más recientemente descubierta vía, la de las lectinas, está a medio camino entre la clásica y la alternativa. No requiere de la presencia de anticuerpos para activarse, aunque sí de una molécula conocida como lectina de unión a manosa (MBL) que reconoce los carbohidratos presentes en la membrana plasmática de los microorganismos (Fujita *et al.*, 2004; Endo *et al.*, 2006). Las tres rutas tienen un punto común que se centra en la ruptura proteolítica del C3 en C3a y C3b. El C3a es capaz de activar los procesos inflamatorios y el C3b se une covalentemente a la superficie del agente extraño sirviendo como opsonina para activar la fagocitosis. Posteriormente se genera una cascada de acontecimientos que

terminan con la formación de un complejo de ataque a la membrana que acaba lisando el patógeno (Abbas & Lichtman, 2000). La acción de las moléculas puede ser local, en el sitio de su producción, pero también puede ejercerse a distancia por dispersión a otras zonas (Nonaka, 2011; Nonaka & Kimura, 2006).

En bivalvos existe una gran abundancia y variabilidad de las proteínas C1qDC que pueden unirse directamente a patógenos y, por tanto, pasar por alto la etapa de reconocimiento Ig-antígeno del sistema inmune adaptativo de vertebrados. Además, tanto lectinas de unión a manosa como ficolinas tienen sus homólogos potenciales en las lectinas de tipo C y FREPs, respectivamente (Gerdol & Venier, 2015). Los bivalvos parecen haber desarrollado un repertorio muy abundante y diversificado de lectinas, con la capacidad de desencadenar una respuesta inmune a través de una cascada de señalización similar a la vía de las lectinas de vertebrados.

Hasta la fecha, no hay mucha información acerca del sistema del complemento en moluscos bivalvos; se han descrito la proteína C3 (Rd-C3) y el factor tipo B (Rd-Bf-like) en la vía alternativa de la almeja *Ruditapes decussatus* (Prado-Alvarez *et al.*, 2009b). Recientemente se han obtenido varios ADNc de *R. decussatus* relacionados con la cascada de la vía alternativa del complemento, apoyando la existencia de esta vía en bivalvos (Moreira *et al.*, 2012a; Prado-Alvarez *et al.*, 2012; L. Zhang *et al.*, 2014) y en otros moluscos (Castellanos-Martínez *et al.*, 2014a).

Las proteínas que contienen el dominio tioéster y el dominio MACPF son posibles homólogos funcionales a los componentes del complemento C3/C4/C5 y C6/C7/C8/C9, respectivamente (Gerdol & Venier, 2015). Una representación esquemática de los posibles homólogos bivalvos relacionados con la ruta del complemento de los vertebrados se muestra en la Figura 12.



**Figura 12.** Las moléculas que podrían desempeñar un papel en un sistema de complemento de bivalvos (en rojo) se ilustran comparativamente con los de vertebrados (en negro). La falta de una vía clásica mediada por inmunoglobulinas de vertebrados puede ser compensada por el repertorio amplio y eficaz de los PRRs (por ejemplo proteínas C1qDC). La existencia de una vía de la lectina es sugerido por lectinas tipo C (CTLs) (funcionalmente homóloga a MBL) y FREPs (funcionalmente homóloga a ficolinas). Se han identificado elementos de la vía alternativa del complemento (por ejemplo homólogos de C3 y factor B). Después de la activación de PRRs, cascadas proteolíticas mediadas, por ejemplo, por TEPs preparan la opsonización del patógeno para su eliminación. A pesar de que las proteínas con dominio MACPF (que caracteriza los componentes C6/C7/C8/C9) se han identificado en mejillón, su participación en la vía terminal del complemento aún no se ha evaluado (Gerdol & Venier, 2015).

#### 1.2.2.2.1 Proteínas que contienen tioéster (TEPs)

TEPs son una familia de proteínas caracterizadas por una única unión tioéster intracatenaria y afines a diferentes interacciones de unión conformación-dependientes (Blandin & Levashina, 2004). Estas proteínas comprenden los componentes del complemento C3, C4 y C5 de vertebrados, así como un número de homólogos de invertebrados, tales como proteínas de insectos que funcionan como opsoninas y favorecen la fagocitosis de bacterias (Bou Aoun *et al.*, 2011). TEPs fueron identificados en los bivalvos *R. decussatus* (Prado-Alvarez *et al.*, 2009b) y *C. farreri* (Zhang *et al.*, 2007). TEPs se han identificado en transcriptomas de ostras *C. virginica* (L. Zhang *et al.*, 2014) y almejas *R. philippinarum* (Moreira *et al.*, 2012a). Cabe destacar que

TEPs procedentes de *C. farreri* (CfTEP) expresan diversos patrones de expresión en respuesta a diferentes enfrentamientos bacterianos, lo que sugiere un importante papel de TEPs en las respuestas inmunes de bivalvos (H. Zhang *et al.*, 2009c).

#### 1.2.2.2.2 Moléculas formadoras de poros (MACPF)

Los componentes terminales del sistema del complemento puede formar un complejo de proteína (el complejo de ataque de membrana, o MAC) en la superficie de bacterias Gram- provocando su lisis. La superfamilia MACPF (nombre de un dominio común a las proteínas del complejo de ataque a la membrana de mamíferos y a perforinas) es la mayor familia de moléculas formadoras de poros en los animales (Tschopp *et al.*, 1986). En moluscos, se han documentado proteínas perforinas en orejas de mar (Kemp & Coyne, 2011; Mah *et al.*, 2004; G. D. Wang *et al.*, 2008). La proteína MACP que contienen el dominio MACPF se ha identificado en *M. galloprovincialis* (Estévez-Calvar *et al.*, 2011); su expresión aumenta en presencia de patógenos y por estimulación de PAMPs, lo que sugiere su implicación en la inmunidad innata. Genes de proteínas que contienen el dominio MACPF parecen estar presentes en genomas de bivalvos; un total de 17 genes se han detectado en el genoma *C. gigas* y 8 en el transcriptoma de *M. galloprovincialis* (Gerdol & Venier, 2015). Tanto formas secretadas de dichas proteínas como unidas a la membrana están presentes en mejillón y ostra, la asociación de ApeC con MACPF indica una combinación fuerte de reconocimiento de patógenos y propiedades de eliminación en la misma secuencia de proteína (Gerdol & Venier, 2015).

#### 1.2.2.3 PRRs de membrana y cascadas de señalización

A diferencia de PRRs extracelulares que parecen desencadenar la muerte de patógenos a través de la vía de las lectinas del sistema del complemento, PRRs unidos a la membrana generalmente poseen un dominio intracelular que, tras el reconocimiento de PAMPs, median en la transducción de señales a través de los principales factores de



transcripción, lo que conduce a la expresión de efectores antimicrobianos y citoquinas proinflamatorias.

#### *1.2.2.3.1 Receptores tipo Toll y vía de señalización*

Los receptores tipo Toll (TLRs) son de los PRRs más exitosos de la respuesta inmune de metazoos (Leulier & Lemaitre, 2008); pertenecen a una familia de proteínas transmembrana con un dominio extracelular característico por presentar repeticiones ricas en leucina (LRRs), y dominios receptor intracelular interleucina-1 / Toll (TIR) (Abbas & Lichtman, 2000). Estas moléculas son responsables de activar cascadas de transducción de señales a partir del reconocimiento de PAMPs, que en último término, activan factores de transcripción que dan lugar a la expresión de genes implicados en la respuesta inmune, induciendo respuestas efectoras antimicrobianas e inflamatorias (Aderem & Ulevitch, 2000; Medzhitov, 2001).

Los TLRs son capaces de unirse a una amplia variedad de PAMPs, incluyendo LPS, componentes de la pared celular bacteriana, flagelina, ARN simple o de cadena doble, por tanto, potencialmente pueden actuar como sensores de bacterias, hongos, virus e incluso protozoos (Beutler, 2004; Campos *et al.*, 2001). La gran versatilidad para unirse a diversos ligandos se explica por su habilidad para construir heterodímeros con otros TLRs y usar co-receptores para el reconocimiento de ciertas moléculas (Ospelt & Gay, 2010), activando así, factores de transcripción tales como factores nucleares kappa- $\tau$  (NF- $\kappa$ ) y factores reguladores de interferón (IRF), lo que conduce en última instancia a la expresión de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y moléculas antivirales (J. Q. Wang *et al.*, 2014). TLR-4 traduce la señal de LPS, desencadenando la expresión de un amplio rango de citoquinas mediadas por MAPKs (proteínas quinasas activadas por mitógenos) y por la vía de señalización NF- $\kappa$ .

Receptores tipo Toll se han caracterizado en bivalvos, primero en *C. farreri*, cuya expresión se incrementa en presencia de LPS de manera dosis dependiente (Qiu *et al.*, 2007) y posteriormente en *C. gigas*, donde se observó que la expresión de TLR aumenta

drásticamente en presencia de la bacteria *Vibrio anguillarum* (Zhang *et al.* 2011a). Además se demostró que la señalización por TLR juega un papel esencial en la activación de hemocitos causada por infecciones bacterianas (Green *et al.*, 2014b; Y. Zhang *et al.*, 2013a). También se han identificado varias ESTs con homología a TLR en la ostra *C. gigas* (Tanguy *et al.*, 2004) y en la vieira *A. irradians* (Song *et al.*, 2006b). En el mejillón *M. galloprovincialis* se han encontrado 23 TLRs, agrupados en 4 grupos diferentes de acuerdo a la organización de LRRs extracelulares (Toubiana *et al.*, 2014).

Componentes claves en la vía de señalización TLR se han identificado en bivalvos, y su expresión aumenta por estimulación con LPS y PGN. Existen evidencias que muestran que en ausencia de este sistema, el organismo se encuentra mucho más susceptible a la invasión por patógenos (Qiu *et al.*, 2007; Tanguy *et al.*, 2004). Además de los TLRs, otras proteínas que contienen el dominio TIR están involucradas en la señalización inmune (O'Neill & Bowie, 2007). Curiosamente, el dominio TIR parece ser generalizado en bivalvos, en el genoma de ostra se han identificado más de 100 proteínas que contienen el dominio TIR (G. Zhang *et al.*, 2012). Todo ello ha demostrado la existencia de esta cascada de señalización y su gran importancia en el sistema inmune de bivalvos.

#### 1.2.2.3.2 *Proteínas de reconocimiento de Peptidoglicano (PGRPs)*

Las proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (PGRPs) son PRRs importantes presentes en todos los metazoos y capaces de unirse específicamente con Peptidoglicano (PGN), componente principal de las paredes celulares bacterianas y ausente en células eucariotas (Royet & Dziarski, 2007). Estos PGRPs desempeñan un papel central en la activación de diversas reacciones inmunes, tales como la fagocitosis y la activación de vías de transducción de señales tipo Toll o Inmunodeficiencia (IMD) con el fin de producir sustancias antimicrobianas capaces de hidrolizar peptidoglicano, protegiendo así al huésped contra la infección. PGRPs se han caracterizado en la ostra



*C. gigas* (Itoh & Takahashi, 2009), en las vieiras *A. irradians* (Ni *et al.*, 2007) y *C. farreri* (Wang *et al.*, 2009b), en la navaja *Solen grandis* (Wei *et al.*, 2012) y en los mejillones *Bathymodiolus azoricus* y *M. galloprovincialis* (Bettencourt *et al.*, 2010; Gerdol & Venier, 2015). En todos ellos existe un tipo corto de PGRP para el reconocimiento extracelular de bacterias con un dominio amidasa conservado en el extremo C; parece ser un PRR versátil que no se limita a la función de reconocimiento y unión a PAMPs, siendo por tanto, un componente indispensable en la inmunidad de bivalvos (Song *et al.*, 2010).

#### 1.2.2.3.3 Receptores “scavengers” (SRs)

El dominio rico en cisteína de los receptores "scavenger" define una superfamilia grande y antigua de receptores scavenger colectivamente conocidos como receptores SRCR-SF; se trata de un tipo principal de receptores endocíticos con multifunciones para reconocer y fagocitar varias PAMPs (Mukhopadhyay & Gordon, 2004). Presentan un dominio conservado y estabilizado por puentes disulfuro, que se puede encontrar asociado con dominios adicionales y co-receptores; estas características confieren a los miembros de SRCR-SF una amplia gama de funciones, estando implicados en procesos de defensa, apoptosis, inmunidad, inflamación y metabolismo lipídico, contribuyendo principalmente a un internamiento celular constante del ambiente externo (Canton *et al.*, 2013).

Los dominios SRCR-SF parecen relativamente frecuentes en los transcriptomas de bivalvos (McDowell *et al.*, 2014). La identificación de un receptor “scavenger” rico en cisteína (SRCR) en *C. farreri* mostró un PRR versátil implicado en el reconocimiento inmunológico capaz de unir diferentes ligandos tales como LPS, PGN, manano y zymosan (Liu *et al.*, 2011).

#### 1.2.2.4 PRRs citosólicas

Además de las extensas familias de PRRs secretadas y unidas a membrana, sensores intracelulares de microorganismos se han identificado recientemente en bivalvos.

##### *1.2.2.4.1 Helicasas ARN similares a gen-1 inducible de ácido retinoico (RLRs) y señalización*

Las helicasas ARN similares a gen-1 inducible de ácido retinoico se conocen como receptores-RIG (RLRs). RLRs se han relacionado con la detección indirecta de ADN de virus, mediada por ARN polimerasa III dependiente de ADN (Chiu *et al.*, 2009). RLRs son capaces de iniciar una cascada de señalización intracelular que conduce, en última instancia, a la producción de interferón y citoquinas pro-inflamatorias a través de la activación de NF- $\kappa$ B y factores reguladores de interferón (IRF) (Thompson & Locarnini 2007; Loo & Gale 2011).

La presencia de genes tipo RIG en equinodermos y cnidarios sugiere un antiguo origen de RLRs (Zou *et al.*, 2009). En bivalvos, el análisis del genoma de ostras *C. gigas* revela ocho proteínas que contienen dominios RIG diferentes, cuatro de ellos casi idénticos a la arquitectura del dominio RLRs de vertebrados (Y. Y. Zhang *et al.*, 2014). La mayoría de las proteínas implicadas en la señalización de RLR son comunes a las vías TLR y IMD; una vía RLR prácticamente completa se ha identificado en *M. edulis* (Philipp *et al.*, 2012). La evidencia de receptores similares a RIG citoplasmáticos de vertebrados apoya la existencia de la señalización RLR en moluscos bivalvos (Gerdol & Venier, 2015).

### **1.2.3 Vías de señalización**

Como hemos visto, el sistema inmune innato está bajo control de una compleja red de vías de señalización conservadas evolutivamente, que se activan dependiendo de diferentes estímulos o invasiones (Cao and Villalba, 2011). Cuando el sistema es desafiado por un patógeno,

diferentes vías de señalización activadas por los PRRs inducen la respuesta inmune sistémica y producen efectores de respuesta. Las cascadas de señalización celular coordinan la inducción de numerosos genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria. Estudios moleculares han identificado genes involucrados en transducción de señales durante la respuesta inmune innata de bivalvos (Song *et al.*, 2010). La Figura 13 muestra una representación de las principales vías de señalización de bivalvos.

#### 1.2.3.1 Vía NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa- $\tau$ )

La vía de señalización NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa- $\tau$ ) es un proceso conservado evolutivamente para activar NF- $\kappa$ B, un factor nuclear que tiene un papel central en la coordinación de la expresión de una amplia variedad de genes que controlan respuestas inmunes (Li & Verma, 2002). En las células en reposo, las proteínas NF- $\kappa$ B están unidas al inhibidor de  $\kappa$ B (I- $\kappa$ B) que las mantienen secuestradas en el citoplasma. La cascada de señalización NF- $\kappa$ B se activa una vez que I- $\kappa$ B es degradado, permitiendo a NF- $\kappa$ B translocarse al núcleo y unirse al ADN para activar la transcripción de genes (Moynagh, 2005). Proteínas como la I- $\kappa$ B quinasa (IKK) forman parte de un complejo que fosforila I- $\kappa$ B en respuesta a citoquinas y señales que permiten activar la cascada de NF- $\kappa$ B. La identificación de estas moléculas en bivalvos, entre otros la de una quinasa de la familia de IKKs y un inhibidor de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) en *C. gigas*, indican la existencia de esta cascada implicada en procesos inmunológicos en moluscos bivalvos (Montagnani *et al.*, 2008, 2004). Esta vía metabólica se ha estudiado intensamente en la ostra perliera *P. fucata*, observando similitudes con la vía de señalización NF- $\kappa$ B de mamíferos, lo que apoya la hipótesis de que dicha vía constituye una antigua forma de regulación de genes inmunológicos que ha permanecido conservada (Xiong *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

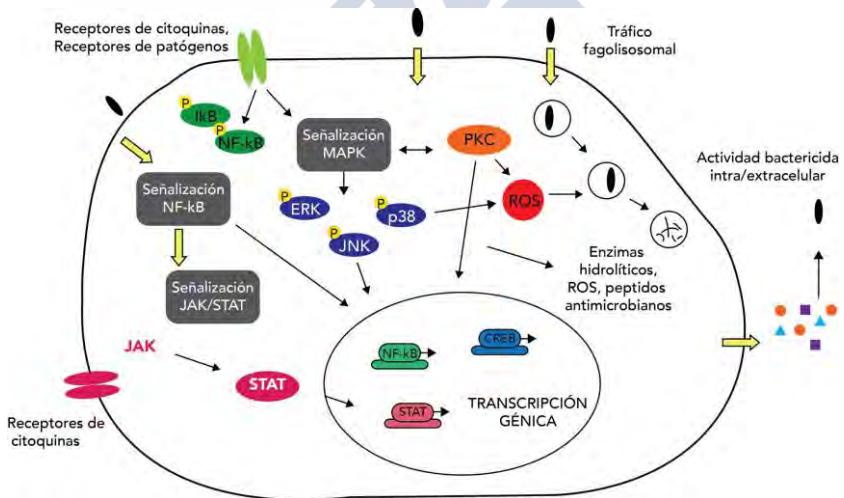
### 1.2.3.2 Vía MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos)

Las cascadas MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) son una de las vías de señalización más importantes en el control de variedad de procesos fisiológicos incluyendo proliferación celular, crecimiento, diferenciación, muerte celular, inmunidad innata, respuestas al estrés ambiental y desarrollo; dicha cascada podría actuar en las vías de señalización intracelulares mediadas por TLR y PGRP de bivalvos (Gerdol & Venier, 2015). MAPKs se pueden activar mediante varias moléculas entre las que se encuentran la proteína quinasa C (PKC) y las GTPasas de la familia Ras. Entre estas GTPasas se encuentra la subfamilia Rho que está implicada en la regulación del crecimiento celular y la apoptosis (Lacal, 1997). La vía MAPK conduce, en última instancia, a la activación del complejo de factores de transcripción AP-1 que regula la expresión de diversos genes relacionados con sistema inmune y el estrés.

En bivalvos hay evidencias de la existencia de esta cascada; los mejillones *M. galloprovincialis* y *B. azoricus*, parecen tener secuencias de los factores de activación de AP-1: JNK (quinasas C-Jun N-terminal) y p38 (proteína quinasa activadas por mitógeno p38) bien conservadas; además su papel en la respuesta inmune de los hemocitos de mejillón parece ser crítico (Bettencourt *et al.*, 2009; Canesi *et al.*, 2002a). Una proteína Jun que responde a infecciones bacterianas se ha descrito en *C. hongkongensis* (Xiang *et al.*, 2014) y se ha identificado en el transcriptoma de las branquias de *B. azoricus* (Bettencourt *et al.*, 2010). La Rho GTPasa activadora de la proteína 6 se ha identificado en la hemolinfa de *R. philippinarum* sin infección al compararlas con individuos infectados por *P. olseni* sugiriendo que podría ser un marcador de resistencia de almejas contra la infección de dicho parásito (Fernández-Boo, 2015).

1.2.3.3 Vía JAK-STAT (quinasas Janus - Transductor de señales y activador de la transcripción)

La vía JAK-STAT (quinasas Janus-Transductor de señales y activador de la transcripción) es una de las vías de señalización importantes activadas por la estimulación de los receptores de citoquinas (Huang *et al.*, 2008). Las quinasas Janus (JAKs) son mediadores centrales en la transducción de la señal y fosforilan residuos de tirosina dentro de dominios celulares del receptor, creando lugares cercanos para el reclutamiento de componentes adicionales de señalización como activadores de factores de transcripción (STAT) (Kile *et al.*, 2001). La cascada de JAK/STAT o señalizadora del interferón contiene proteínas STAT que son factores de transcripción esenciales para la respuesta de las células inmunes. Esta cascada parece estar bastante conservada en *M. galloprovincialis* (Canesi *et al.*, 2003, 2006a).



**Figura 13.** Señalización de las principales vías involucradas en la respuesta inmune de hemocitos de bivalvos. MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos; ERK: quinasa regulada extracelularmente; p38: MAPK p38 activada por estrés; JNK: quinasas C-Jun N-terminal; PKC: proteína quinasa C; JAK: Janus quinasa activada; STAT: transductor de señal y activadores de transcripción; CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc; NF-kB: Factor nuclear kB; ROS: especies reactivas de oxígeno. (Imagen adaptada de Canesi *et al.* 2006a).

### **1.2.4 Factores humorales (Secreción de moléculas efectoras inmunes)**

La inmunidad innata abarca una compleja serie de reacciones de defensa, en la que, además de los efectores celulares, hay efectores moléculares extracelulares que actúan como ejecutores para la incapacitación y eliminación de los invasores. La inmunidad de bivalvos se basa en la producción de efectores moleculares que son activos contra una amplia gama de patógenos y/o sensibles al estrés ambiental y que juegan un papel fundamental en las respuestas inmunes innatas (Song *et al.*, 2010).

#### **1.2.4.1 Péptidos antimicrobianos (AMPs)**

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son componentes humorales del sistema inmune innato, presentes en todos los metazoos y esenciales en las reacciones de defensa inmediata de organismos invertebrados carentes de defensa adaptativa. Son moléculas de entre 12 y 50 aminoácidos, catiónicas e hidrofóbicas (Brown & Hancock, 2006), que forman parte de la defensa del organismo participando en el reconocimiento de patógenos y que poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas, con el objetivo de conseguir la destrucción del invasor a través de la opsonización o por muerte directa (Canesi *et al.*, 2002b; Tiscar & Mosca, 2004). El conjunto de todos los AMPs puede representar cerca del 40% del transcriptoma de los hemocitos de mejillones inyectados con virus y bacterias, por lo que se considera que los genes que codifican AMPs constituyen los principales componentes humorales del sistema inmune innato (Pallavicini *et al.*, 2008). Los AMPs tienen poco o ninguna especificidad funcional y poseen un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y negativas, hongos, levaduras, virus y protozoos (Ellis *et al.*, 2011). Tras su formación se almacenan en los gránulos de los hemocitos y son liberados como respuesta a la estimulación por patógenos (Mitta *et al.*, 1999b, 2000c). Su actividad se ha observado tanto en el interior hemocitario como en el exterior, expulsándose a la hemolinfa con el fin de participar en



respuestas sistémicas del huésped (Mitta *et al.*, 2000d). Estas moléculas poseen actividad formadora de poros y efecto detergente, que rompe la membrana del patógeno produciendo en muchos casos la lisis del microorganismo (C. H. Li *et al.*, 2009).

En invertebrados marinos se han encontrado diferentes tipos de AMPs (Sperstad *et al.*, 2011), en varios moluscos bivalvos se han caracterizado a nivel molecular varios péptidos antimicrobianos; es el caso de la ostra *C. gigas* (Gueguen *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2007a), en la almeja *R. decussatus* (Gestal *et al.*, 2007), en la vieira *A. irradians* (Zhao *et al.*, 2007) y en los mejillones *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis* (Charlet *et al.*, 1996; Mitta *et al.*, 2000a, 2000b, 1999a), siendo estos últimos los más estudiados. Concretamente en *M. galloprovincialis*, los AMPs descritos son todos ricos en cisteínas y se han clasificado en varios grupos en función del número y posición de estos residuos aminoacídicos. El primero de ellos está formado por dos moléculas con una gran homología a las defensinas descritas previamente en artrópodos (Bulet *et al.*, 1999), de ahí que el nombre adoptado sea “*M. galloprovincialis* defensin” (MGD-1 y MGD-2) para las dos isoformas detectadas. Las defensinas son la familia más extendida de AMPs de invertebrados (Mitta *et al.*, 2000a, 1999b). Se han identificado tres genes defensina en *C. gigas* que expresan una notable diversidad de secuencias moleculares (Schmitt *et al.*, 2010). El segundo de los grupos está constituido por las mitilinas y está formado por 4 isoformas diferentes (B, C, D y G1) (Mitta *et al.*, 2000b); la forma A se ha detectado en *M. edulis* pero no en *M. galloprovincialis* (Charlet *et al.*, 1996). El siguiente grupo está compuesto por dos isoformas de miticina: miticina A y miticina B (Mitta *et al.*, 1999a; Pallavicini *et al.*, 2008). Se ha encontrado la miticina C, que además de actuar como AMP, es una molécula implicada en inmunomodulación, debido a sus propiedades quimiotácticas (Balseiro *et al.*, 2011). Otro de los AMPs son las mytimicinas, el único péptido estrictamente antifúngico (Charlet *et al.*, 1996).

Las miticinas y las defensinas son esencialmente activas contra bacterias Gram positivas (Mitta *et al.*, 1999a, 1999b) y algunos patógenos asociados a invertebrados marinos (Friedman *et al.*, 1991).

Sin embargo, las mitilinas tienen una actividad más diversificada ya que su rango de acción abarca desde actividades antifúngicas hasta acciones microbicidas contra bacterias Gram negativas (Mitta *et al.*, 2000a, 2000b).

Recientemente se han descubierto dos grupos nuevos de AMPs llamadas gran defensinas y mytimacinas en *M. galloprovincialis* (Gerdol *et al.*, 2012). Las gran defensinas también se han identificado en otros bivalvos, entre ellos en ostras *C. gigas* (Rosa *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2010, 2007).

#### 1.2.4.2 Lisozimas

Las lisozimas son enzimas ubicuas presentes en numerosos organismos filogenéticamente diversos tales como bacterias, bacteriófagos, hongos, plantas y animales; catalizan la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1-4 glicosídicos existentes entre el ácido N-acetilmurámico y los residuos de N-acetilglucosamina presentes en el PGN de la pared celular bacteriana, provocando la lisis de bacterias (Bachali *et al.*, 2002). Las lisozimas se almacenan en el interior de los lisosomas de los hemocitos (Mohandas *et al.*, 1985). El mecanismo de liberación al suero no lleva asociado la ruptura de la membrana plasmática, sino que las enzimas se liberan al medio mediante un proceso conocido como desgranulación (Cheng *et al.*, 1975). Es ampliamente aceptado que las funciones de las lisozimas como moléculas efectoras son cruciales en el sistema inmune contra patógenos, pero además sirven como enzimas digestivas, encontrándose actividad lisozímica en el hepatopáncreas de diversos bivalvos (McHenery & Birkbeck, 1982).

Varias lisozimas y sus actividades se han caracterizado en bivalvos, es el caso de la ostra plana *O. edulis*, donde esta enzima aparece en la hemolinfa y en el manto de la ostra; su actividad es un buen indicador de la condición y vitalidad del sistema defensivo del organismo (Cronin *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2006). Además se han caracterizado lisoenzimas en las ostras *C. virginica*, (Xue *et al.*, 2004) y *C. gigas* (Itoh & Takahashi, 2007). En *M. edulis* se identificaron hasta cuatro lisozimas distintas con múltiples formas que



parecen poseer funciones distintas (Olsen *et al.*, 2003). Varias lisozimas de *M. galloprovincialis* mostraron expresión tisular y comportamientos diversos frente a la exposición a bacterias, sugiriendo distintas funciones; unas más relacionadas con la digestión del individuo y otras implicadas en la respuesta inmune (Ji *et al.*, 2013; Q. Wang *et al.*, 2012). Recientemente se ha identificado un tipo de lisozima en la almeja *R. philippinarum* (Ding *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que las lisozimas podrían aumentar la actividad de los AMPs a través de mecanismos sinérgicos (Haug *et al.*, 2004).

#### 1.2.4.3 Integrinas

Las integrinas pertenecen a una familia de receptores transmembrana que son responsables de procesos de adhesión y desplazamiento celular, desgranulación, fagocitosis y encapsulación en invertebrados. La respuesta inmune celular de hemocitos de bivalvos también está modulada por integrinas, que conllevan la transmisión de señales adecuadas en el citoplasma (Tyrer *et al.*, 2006). La caracterización de una  $\zeta$ -integrina en hemocitos de *C. gigas* implicada en procesos de apoptosis y adhesión hemocitaria mostró además que la fagocitosis en los hialinocitos de la ostra está regulada por un mecanismo dependiente de integrinas y que los granulocitos podrían poseer otros receptores para llevar a cabo este papel (Terahara *et al.*, 2006). Recientemente, en larvas del mejillón *Mytilus trossulus* se estudió la expresión tisular de una proteína similar a una integrina, y su relación con la diferenciación celular (Odintsova & Maiorova, 2012).

#### 1.2.4.4 Citoquinas

Las citoquinas son glicoproteínas sintetizadas durante la fase efectora de la respuesta inmune con el fin de eliminar a los patógenos (Liew & Cox, 1991). Se trata de proteínas mensajeras de bajo peso molecular (entre 15-30 KDa) constituidas por 120-180 aminoácidos, cuya expresión está estrictamente regulada. Estas moléculas que

participan en la regulación y señalización de la respuesta inmune, abarcan un elevado número de efectores incluyendo interleuquinas (ILs), interferones (IFNs), factores de necrosis tumoral (TFNs) y quimiocinas (Roberts *et al.*, 2008).

Las citoquinas están relacionados con varias funciones inmunes como inflamación, proliferación, cambios en la morfología y motilidad celular, quimiotaxis (Hughes *et al.*, 1990; Ottaviani *et al.*, 1995), inducción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), citotoxicidad, apoptosis y aumento de la actividad fagocítica a través de mecanismos de transducción de señales (Barcia & Ramos-Martinez, 2008; Ottaviani *et al.*, 2004, 1997). Pueden ser liberadas a través de la señalización mediada por el receptor del complemento o por patógenos a través de una amplia gama de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Lacy & Stow, 2011).

La primera citoquina identificada en ostras fue IL-17 en *C. gigas*, cuya expresión aumenta significativamente tras el enfrentamiento con bacterias (Roberts *et al.*, 2008). Más recientemente, se identificaron cinco nuevos homólogos de IL-17 en el genoma de *C. gigas*, que presentan un incremento significativo de su expresión en hemocitos después de diferentes ensayos de inmunoestimulación (Li *et al.*, 2014). Parece que IL-17 es fundamental en la producción de AMPs de ostra.

Dos citoquinas inflamatorias se han identificado en bivalvos: el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) en *M. galloprovincialis* (Parisi *et al.*, 2012), y el factor inflamatorio de aloinjerto (AIF), capaz de estimular la actividad fagocítica de los granulocitos, que se ha identificado en diferentes especies de ostras, entre ellas en *O. edulis* (Li *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013; Martín-Gómez *et al.* 2014b). Una secuencia similar a TNF $\alpha$  se identificó por primera vez en moluscos en en la oreja de mar *Haliothis discus* (De Zoysa *et al.*, 2009a), investigaciones más recientes condujeron a la identificación de esta citoquina multifuncional en *O. edulis* (Martín-Gómez *et al.*, 2014a).

Varios tipos de receptores de citoquinas se han caracterizado en bivalvos (Herpin *et al.*, 2005; L. Li *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2011), lo que indica que los distintos tipos de citoquinas están presentes en estos organismos. Los hemocitos de los mejillones *M. edulis* y *M. galloprovincialis* pueden responder a la administración de diferentes citoquinas como al TNF, IL-1, IL-6 (Hughes *et al.*, 1992, 1991) y a IL-8 e IL-2 (Novas *et al.*, 2004; Ottaviani *et al.*, 2000). Aunque no se ha detectado ninguna interleuquina como tal en mejillón, se ha detectado la presencia de la subunidad  $\alpha$  del receptor de la IL-2 (IL-2R), que incrementa su expresión tras la estimulación con LPS (Barcia *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2004a). La adición de moléculas heterólogas del TNF activa una cascada de transducción de señales en hemocitos de bivalvos similar a la que ocurre en vertebrados, donde participan las proteínas quinasas activadoras de mitógenos (MAPK) (Betti *et al.*, 2006). En la vieira *C. farreri* y en la ostra perlífera *P. fucata* se ha identificado el factor de transcripción inducido por LPS (LITAF), que activa al promotor del TNF para inducir su expresión, observando que su expresión aumenta en presencia de LPS (Yu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009). El mismo gen se ha caracterizado en *C. gigas* donde se observó una acumulación del transcrito en hemocitos tras una exposición bacteriana (Park *et al.*, 2008).

Varios adaptadores citoplasmáticos pertenecientes a la cascada de señalización correspondiente al TNF se han caracterizado en *C. farreri* y son regulados diferencialmente en respuesta a LPS, PGN o  $\alpha$ -glucanos (J. Yang *et al.*, 2011a). Otro miembro de la superfamilia del TNF, TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF) se identificó en *Crassostrea ariakensis* (Yang & Wu, 2010). El factor inhibidor de migración de macrófagos (MMIF) se ha descrito en la ostra perlífera *P. fucata*, donde su expresión parece aumentar frente a *Vibrio alginolyticus* (Cui *et al.*, 2011). Otra citoquina proinflamatoria descrita como HMGB (“high mobility group box”) se descubrió en *C. ariakensis* (Xu *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta la amplia respuesta inmune de las citoquinas, un sistema de "ligando-receptor" múltiple y específico debe existir

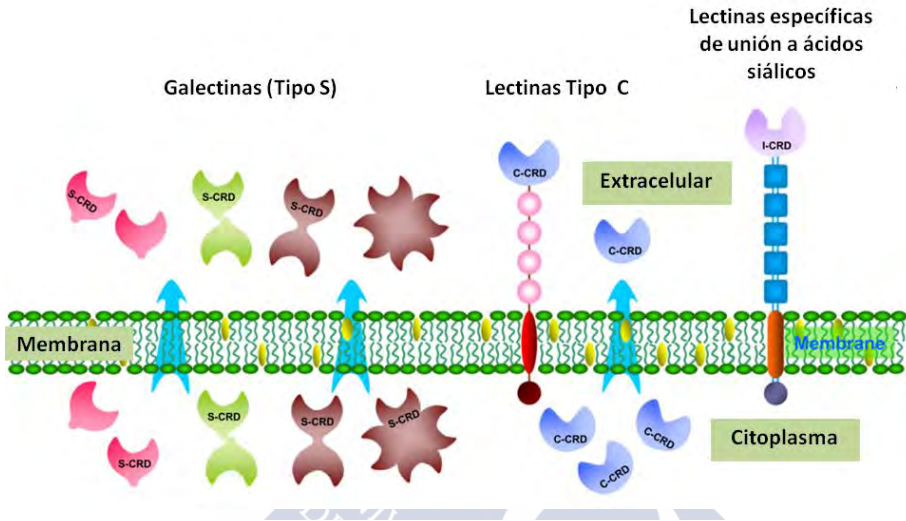
como mecanismo importante de regulación en la inmunología de bivalvos (Song *et al.*, 2010).

#### 1.2.4.5 Lectinas

Además de las lectinas tipo C detalladas anteriormente como PRRs extracelulares, existen otros tipos de lectinas. Se trata de proteínas ubicuas solubles asociadas a la membrana, que presentan dominios específicos de reconocimiento de carbohidratos (CRD), con elevada especificidad, lo que facilita las interacciones entre el hospedador y la microbiota, dando origen a respuestas inmunes innatas (Kilpatrick, 2002; McGreal *et al.*, 2004). Están implicadas en procesos de reconocimiento de partículas extrañas, inflamación, interacciones intercelulares e interacciones entre células y matriz extracelular. Se pueden localizar en la membrana plasmática de los hemocitos o libres en el suero (Vasta *et al.*, 1984), llegando a constituir hasta el 80% de la proteína soluble de la hemolinfa de moluscos (Odo *et al.*, 1995). Numerosas lectinas de moluscos poseen la capacidad de aglutinar (aglutininas) y en ocasiones opsonizar bacterias u otros parásitos (Bayne, 1990). Estas moléculas funcionan como patrones de reconocimiento de patógenos (PRRs). El papel de las lectinas en el sistema inmune es fundamental ya que al unirse específicamente a polisacáridos y glicoconjugados presentes en la superficie de microorganismos median los procesos de fagocitosis, melanización y encapsulación (Bayne *et al.*, 1979), así como la activación del sistema profenoloxidasa (pro-PO) (Yu *et al.*, 2005). Al mismo tiempo, son protagonistas de la tercera vía de activación del complemento, descrita recientemente y conocida como Vía de las lectinas, la cual parece ser una vía intermediaria entre la vía clásica y la alternativa (Fujita *et al.*, 2004).

En base a sus características estructurales y funcionales se pueden distinguir entre ocho y quince grupos de lectinas relacionadas con la inmunidad: tipo C, tipo S o galectinas de unión al glucano, tipo I o específicas de unión a ácidos siálicos y glucosaminoglucanos, pentraxinas, fucolectinas, ficolinas, taquilectinas, proteínas relacionadas con el fibrinógeno (FREPs), lectinas gicalina H, lectinas

tipo E, lectinas tipo F y lectinas tipo quitinasa entre otras (Adhya *et al.*, 2010; Kolarich *et al.*, 2012; Lehmann *et al.*, 2006; Tasumi & Vasta, 2007; Vasta, 2009; Yamaura *et al.*, 2008) (Figura 14).



**Figura 14.** Boceto de tres de las lectinas más comunes (galectinas o lectinas de tipo S, lectinas de tipo C y lectinas específicas de unión a ácidos siálicos) recientemente caracterizados en bivalvos marinos. S-CRD: dominio de reconocimiento de carbohidratos tipo S en galectinas; C-CRD: dominio de reconocimiento de carbohidratos tipo C en lectinas. Las lectinas tipo C puede ser libres o unidas a membrana. Las lectinas de unión a ácido siálico están unidas a la membrana. (Imagen adaptada de Soudant *et al.* 2013).

Diversas lectinas se han identificado en ostras; en *C. gigas*, las lectinas gígalina H y E actúan como opsoninas que estimulan la fagocitosis de la bacteria *Vibrio anguillarum* "in vitro" (Olafsen, 1995). En la ostra *Ostrea chilensis* se caracterizó una lectina dependiente de calcio (Minamikawa *et al.*, 2004). La expresión de la lectina de unión al ácido siálico de *Crassostrea hongkongensis* es inducida durante la exposición a *Vibrio alginolyticus* (He *et al.*, 2011). En *P. fucata* se ha identificado una lectina tipo F (Anju *et al.*, 2013b).

La infección bacteriana es también responsable del aumento de la expresión de una lectina de tipo F en la ostra *Pinctada martensii* (J. Chen *et al.*, 2011). En otros bivalvos, como en la vieira *C. farreri* se identificó una lectina con capacidad de aglutinar bacterias *Staphylococcus haemolyticus* (Zheng *et al.*, 2008), o en la almeja *R. philippinaram* donde se han encontrado hasta 7 lectinas diferentes con una expresión diferenciada en el hemocito dependiendo de si la infección es bacteriana o producida por protozoos, en particular el protozoo parásito *P. olseni* (Kang *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2008; Adhya *et al.*, 2010; Moreira *et al.*, 2012b). Mediante un enfoque proteómico se encontraron varias lectinas en la hemolinfa de *R. philippinarum* con un interés especial por su interacción entre la almeja y el parásito *P. olseni* (Fernández-Boo, 2015). Cada vez hay más evidencia para apoyar la idea de que la presencia de diversas isoformas y funciones de las lectinas proporcionan a los bivalvos una diversidad funcional de la respuesta inmune innata.

#### 1.2.4.6 Enzimas antioxidantes

Bajas concentraciones de ROS son necesarias e incluso indispensables en la transducción de señales y en la defensa contra microorganismos. Sin embargo, una producción excesiva de ROS conlleva un estrés oxidativo, pérdida de funcionalidad celular y por último apoptosis y muerte (Apel & Hirt, 2004), por lo que existen mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo mediante la interacción de una red de enzimas antioxidantes en las propias células del molusco. En bivalvos se ha identificado un gran número de estas enzimas, y se ha estudiado su respuesta contra el enfrentamiento a patógenos y al estrés ambiental. Las enzimas más efectivas en la detoxificación de ROS, que desempeñan un papel protector contra los daños celulares causados por la exposición a sustancias oxidantes incluyen la superóxido dismutasa (SOD), catalasa/peroxidasa, oxidasas de cobre, y el glutatión en combinación con las enzimas glutatión peroxidasa y reductasa (Aladaileh *et al.*, 2007a; Gonzalez *et al.*, 2005; Tafalla *et al.*, 2003).



#### 1.2.4.6.1 Superóxido Dismutasa (SOD)

Las enzimas Superóxido Dismutasas (SODs) son una familia de metaloenzimas antioxidantes que catalizan la transformación de los radicales superóxido producidos por el metabolismo oxidativo celular en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno molecular ( $O_2$ ) (Fridovich, 1995). Se trata del primero y más importante de los sistemas de defensa enzimáticos antioxidantes contra las especies reactivas de oxígeno (Anju *et al.*, 2013a), evitando la generación de radicales de hidroxilo altamente tóxicos. Las SODs se dividen en cuatro grupos distintos dependiendo del metal que contengan: Hierro (FeSOD), Manganeseo (MnSOD), Cobre y Zinc (Cu/ZnSOD) o Níquel (NiSOD). Varios trabajos destacan la importancia de las SODs en la respuesta inmune y en el papel de protección celular frente a varios desafíos (Bao *et al.*, 2008). Genes de SODs se han identificado en *C. farreri*, donde se observó una rápida elevación de la actividad SOD tras la infección microbiana (Xing *et al.*, 2008). La actividad SOD en el manto y branquias de *M. galloprovincialis* se incrementa notablemente con la exposición a contaminantes químicos tóxicos, especialmente a metales pesados (Vlahogianni *et al.*, 2007). En *Chamelea gallina*, la actividad SOD disminuye con el incremento de la temperatura o la exposición a benzo[a]pyrene (Monari *et al.*, 2009, 2007). Elevados niveles de expresión de ARNm de MnSOD fueron detectados en las branquias y manto de *A. irradians* tras ser desafiado con *V. anguillarum*, siendo una enzima necesaria en la respuesta inmune contra dicha bacteria. Cu/Zn EcSOD es uno de los genes candidatos a jugar un papel central en la resistencia de *C. gigas* frente a la mortalidad estival (Fleury & Huvet, 2012). La expresión génica de Cu/ZnSOD de *C. gigas* también varía en respuesta al virus OsHV-1 (Normand *et al.*, 2014). Por tanto, las SODs son proteínas que juegan un papel crucial en la defensa de los bivalvos tanto contra patógenos como contra contaminantes y estrés ambiental.

#### 1.2.4.6.2 Catalasa (CAT)

Las catalasas son uno de los grupos principales en la captura del exceso de ROS. Esta enzima cataliza la descomposición de  $H_2O_2$  en oxígeno molecular ( $O_2$ ) y agua ( $H_2O$ ) (Chelikani *et al.*, 2004). Se trata de una enzima ubicua, presente en organismos arqueas, bacterias y eucariotas. En los últimos años se han documentado diferentes genes y proteínas con actividad catalasa en bivalvos como en *M. edulis* (Letendre *et al.*, 2009), *Dreissena polymorpha* (Contardo-Jara *et al.*, 2009), *C. gigas* (Damiens *et al.*, 2004) y *C. farreri* (C. Li *et al.*, 2008). La expresión de CAT de *C. farreri* aumenta gradualmente tras la infección con *Vibrio* sp. En *M. edulis*, la actividad CAT se incrementa entre 2-3 veces en áreas costeras contaminadas. El aumento de la actividad catalasa en *M. galloprovincialis* se encuentra significativamente relacionada con la temperatura, la salinidad y la duración de las horas de luz (Vlahogianni *et al.*, 2007). La importancia de las enzimas catalasa en la regulación del estrés oxidativo es ampliamente reconocida. CAT es considerada un biomarcador de gran interés, sensible al estrés ambiental, que se utiliza para detectar el efecto biológico en el estado redox de los organismos bivalvos (Song *et al.*, 2010).

#### 1.2.4.6.3 Glutación Peroxidasa (GPx)

GPx es el nombre general de una familia de enzimas con actividad peroxidasa, cuyo principal papel biológico es proteger al organismo del daño oxidativo. Su función es reducir hidroperóxidos lipídicos a sus correspondientes alcoholes y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a agua. La detección de actividad GPx y la identificación de moléculas GPx sugieren que dichas enzimas pueden responder a la infección bacteriana y a la exposición a peróxido de hidrógeno, estando implicados en la protección frente al estrés oxidativo y en la defensa inmune de bivalvos (Soldatov *et al.*, 2007). Actividad GPx se ha detectado en los siguientes organismos bivalvos; *Corbicula fluminea* (Bigot *et al.*, 2009), *Pinna nobilis* (Box *et al.*, 2009), *M. galloprovincialis* (Soldatov *et al.*, 2007), *R. decussatus* (Bebiano *et*



*al.*, 2004). Además se han publicado estudios sobre genes GPx clonados de bivalvos, tales como *D. polymorpha*, *Unio tumidus* y *C. gigas* (Jo *et al.*, 2008).

#### 1.2.4.6.4 Glutación S-Transferasa (GST)

Las GSTs comprenden una clase de dímeros de proteínas enzimáticas que catalizan la conjugación de glutatión a una amplia variedad de compuestos hidrófobos a través de la formación de un enlace tioéter con su centro electrófilo. GSTs son las principales enzimas de desintoxicación, se encuentran principalmente en el citosol y funcionan como un sustrato de enzimas antioxidantes para eliminar el oxígeno reactivo inducido por los compuestos xenobióticos, proporcionar protección contra electrófilos y productos del estrés oxidativo (Hoarau *et al.*, 2002). Poblaciones de mejillones expuestas a aguas residuales no tratadas exhiben alta actividad GST como resultado de un aumento de las actividades de conjugación (Moreira & Guilhermino, 2005). También se observó un rápido aumento de las actividades GST en cultivos de *Pecten maximus* tratados con tributilo, sulfonato de etilmetano y la fracción soluble en agua de petróleo crudo, de manera dosis dependiente (Le Pennec & Le Pennec, 2003). Las GSTs de bivalvos se han utilizado como biomarcador ambiental ya que responden a la exposición potencial de contaminación ambiental.

#### 1.2.4.7 Metalotioneínas (MTs)

Las metalotioneínas (MTs) son una superfamilia de proteínas ricas en cisteína de bajo peso molecular con alta afinidad por metales pesados y presentes en una amplia variedad de organismos. Diversas funciones se han atribuido a las MTs, tales como homeostasis y detoxificación en respuesta a metales, captura de radicales libres y protección contra estrés oxidativo. Se han identificado MTs en moluscos bivalvos como *M. galloprovincialis* expuestos a ambientes contaminados (Fasulo *et al.*, 2008). En *P. viridis* se encontró una relación negativa entre el índice de condición y la cantidad de MT

(Lemus *et al.*, 2013). En *A. irradians* se observó un aumento drástico de dicha proteína después de la exposición a cadmio y a bacterias (Wang *et al.*, 2009a), además de observar varias isoformas asociadas con la susceptibilidad o tolerancia al estrés térmico (Yang *et al.*, 2013). También se han observado distintas isoformas de MT en *C. gigas* que mostraban una asociación preferencial por distintos metales como cadmio, cobre o zinc (Piano *et al.*, 2004) y parecían indicar una susceptibilidad diferencial a la mortalidad estival (David *et al.*, 2012). En *C. hongkongensis* se observó una sobre-expresión de MT asociada a la exposición prolongada a metales (Luo *et al.*, 2014). En *O. edulis* la expresión de la proteína aumenta significativamente en tejidos de individuos expuestos a estrés térmico (Jenny *et al.*, 2004). Por tanto, las metalotioneínas están claramente implicadas en el sistema defensivo de bivalvos.

#### 1.2.4.8 Proteínas de choque térmico (HSPs)

Las proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins, HSPs) presentan funciones relacionadas con procesos de plegamiento proteico, donde actúan como chaperonas ayudando a la obtención de la estructura tridimensional de las proteínas, lo que les confiere un papel fundamental en procesos de desarrollo y de diferenciación celular, tráfico proteico y proteólisis. Desempeña papeles importantes en respuesta a condiciones de estrés potencialmente dañinas, al evitar toxicidad y muerte celular protegiendo células y tejidos contra el daño (Robert, 2003; Tsan & Gao, 2009). Además dichas proteínas también están relacionadas con la defensa frente a patógenos (Wirth *et al.*, 2002; Pockley, 2003).

La exposición de células de una amplia variedad de organismos a grandes variaciones de temperatura induce la síntesis de proteínas HSP, que por detectarse de este modo, se denominan proteínas de choque térmico. Sin embargo se ha demostrado que la expresión de las mismas puede verse también inducida por otros estímulos estresantes como hipoxia, la presencia de metales pesados, radicales de oxígeno, radiación, cambios osmóticos, agentes físicos y químicos o cualquier otro factor que produzca un estrés celular (Veldhuizen-Tsoerkan *et al.*,

1991). Las proteínas HSP están codificadas por una familia de genes conservados en la evolución, presentes tanto en organismos eucariotas como procariotas. Se clasifican en subfamilias dependiendo de su peso molecular que puede variar entre 15 y 110 kDa; aquellas con un peso molecular entre 12 y 43 kDa se conocen como pequeñas HSPs (small Heat Shock Proteins, sHSPs) (Hightower & Hendershot, 1997; Jaya *et al.*, 2009).

Se ha llevado a cabo la caracterización molecular de algunas formas de HSP así como de una proteína emparentada con ellas que, debido a su semejanza, se la conoce como proteína cognada de choque térmico o HSC. Son varias las especies de moluscos donde se han caracterizado parcial o totalmente alguna de estas proteínas; en el caso de la ostra *C. gigas* se han identificado la HSC72 y 70 así como la HSP70 (Boutet *et al.*, 2003b; Gourdon *et al.*, 2000). En *C. virginica* se ha clonado y analizado una secuencia de HSP70 (Rathinam *et al.*, 2000), la expresión de varios HSPs (HSP60, HSP69, HSP72-77 y HSP90) se han estudiado en la misma especie como respuesta al estrés térmico y a la exposición a metales (Ivanina *et al.*, 2009). En *O. edulis* se caracterizaron las formas genómicas y de cDNA de la HSC y HSP70, la expresión de esta última es un signo temprano de estrés termal, además de indicar exposición a metales pesados (Boutet *et al.*, 2003a; Piano *et al.*, 2004, 2002). En las vieiras *A. irradians* y *C. farreri*, se caracterizaron la HSP70 y 90 respectivamente (Gao *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2006a), ambas proteínas también fueron detectadas en la oreja de mar, *Haliotis tuberculata* (Farcy *et al.*, 2007). En *M. galloprovincialis* se identificó la unidad transcripcional del gen *hsp70* y varias formas expresadas en el citoplasma (Kourtidis *et al.*, 2006; Kourtidis & Scouras, 2005). En *C. hongkongensis* se observó una inducción de HSP70 como respuesta al cobre y otros contaminantes (Zhang & Zhang, 2012).

A pesar de que tradicionalmente la expresión de las HSPs se ha utilizado como marcador en procesos de estrés y contaminación, su modulación también se ha relacionado con procesos inmunes ya que su expresión se ha visto incrementada tras la estimulación de hemocitos de bivalvos con *Vibrio anguillarum* (Cellura *et al.*, 2007;

Song *et al.*, 2006a). En el berberecho *Cerastoderma edule* la expresión de HSP70 y 90 se ve modificada como respuesta a neoplasia (Díaz *et al.*, 2010). En la almeja *Tegillarca granosa* se observó una sobreexpresión de sHSPs después de su exposición a *Vibrio parahaemolyticus* y LPS, confiriéndoles un papel en la inmunidad contra bacterias (Bao *et al.*, 2011). HSP90 se describió en *C. hongkongensis* y su expresión se ve inducida en hemocitos expuestos a elevada salinidad y a distintas bacterias, lo que sugiere roles en la respuesta al estrés osmótico y a la invasión bacteriana (Fu *et al.*, 2011). Se han identificado diferencias en la expresión de HSP70 entre grupos de ostras de *O. edulis* y entre las especies *O. edulis* y *C. gigas*, sugiriendo que dichas diferencias puedan estar relacionadas con la susceptibilidad a estrés y a enfermedades como bonamiosis (Comesaña Lestayo, 2008). Se ha demostrado que una HSP90 de *B. ostreae* participa en la internalización del parásito en los hemocitos de *O. edulis* (Prado-Alvarez *et al.*, 2013). Además se han encontrado varias ESTs con homología a HSP en varias librerías construidas tras una estimulación bacteriana o parasitaria (Gestal *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2006; Tanguy *et al.*, 2004) apoyando la hipótesis del posible papel de HSPs en mecanismos de defensa. De manera que las HSPs podrían utilizarse como potentes biomarcadores de contaminación ambiental, además de servir como indicadores de salud en organismos bivalvos.

#### 1.2.4.9 Péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos son proteínas que se sintetizan en las células en forma de prepropéptidos de gran tamaño, los cuales se rompen y modifican para dar lugar a productos activos. Como moléculas de señalización, los péptidos bioactivos juegan importantes papeles en las funciones fisiológicas y en la patogénesis (Sharma *et al.*, 2011). En hemocitos de bivalvos, se han identificado algunos receptores de péptidos bioactivos como la proopiomelanocortina (POMC), la  $\beta$ -endorfina, hormona adrenocorticotrófica (HTCA) y receptores de  $\alpha$ -melanotropina (Ottaviani *et al.*, 1998; Stefano *et al.*, 1989).

#### 1.2.4.10 Profenoloxidasa (proPO)

La fenoloxidasa (PO) es una enzima dependiente de cobre, que cataliza la reacción mediante la que se convierten sustancias fenólicas a quinonas inestables como la dopaquinona. Dicha enzima se presenta inicialmente inactiva en su forma de pro-enzima (proPO), la cascada de proPO se desencadena tras la activación mediante una serie de estímulos, entre los que destacan moléculas derivadas de microbios, tales como los componentes de la pared celular de levaduras y bacterias como los  $\beta$ - glucanos, el LPS o los peptidoglicanos. Los PRRs se unen estas moléculas e inician el sistema proPO a través de una cascada proteolítica rápida. El paso del precursor proPO a la forma activa requiere una cascada de señales mediadas por proteasas serínicas (Cerenius *et al.*, 2010). Finalmente, se produce una reacción proteolítica mediada por la enzima activadora de la proPO (ppA) que da lugar a la PO en su forma enzimáticamente funcional mediante un proceso muy similar a lo que ocurre en la cascada del complemento (Cerenius & Söderhäll, 2004). Entre las diferentes funciones de este sistema pro-PO se encuentra la de activar el proceso de fagocitosis y encapsulación (Söderhäll & Cerenius, 1998).

La presencia de la PO se ha demostrado en varios bivalvos, entre otros en la ostra del pacífico *C. gigas* (Hellio *et al.*, 2007). En la misma especie la estimulación de la actividad PO por diferentes inductores se ha detectado en estadios muy tempranos en el desarrollo de la ostra (Thomas-Guyon *et al.*, 2009). En *R. philippinarum* se observó que ciertos metales iónicos inhibían la actividad PO (Cong *et al.*, 2005). Dicha enzima también se ha identificado en *M. galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997b) y en *R. decussatus* (López *et al.*, 1997c). En la ostra *Saccostrea glomerata* el proceso de fagocitosis estimula la actividad enzimática de la fenoloxidasa, lo que conlleva una mecanización importante de los fagosomas, tanto por estimulación con diversos inductores del sistema inmune (Aladaileh *et al.*, 2007), como con el parásito *Martelia sydneyi*, siendo un sistema clave en la defensa contra dicho protozoo (Butt & Raftos, 2008). A pesar de que la actividad fenoloxidasa no mostró diferencias significativas entre ostras *O. edulis* libres de infección y ostras

infectadas por *B. ostreae*, se observó una tendencia constante de menor actividad fenoloxidasa en las ostras infectadas, sugiriendo una posible inhibición de esta actividad por el parásito o la propensión de ostras con baja actividad fenoloxidasa a adquirir la infección (Comesaña 2008). En todas estas especies, la presencia de la proPO se ha detectado tanto en la hemolinfa como en el interior de los hemocitos (Hellio *et al.*, 2007). Además, la expresión de la proPO se puede modular por estímulos como bacterias o parásitos (Bezemer *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2006).

#### 1.2.4.11 Proteínas plasmáticas principales

Las proteínas plasmáticas principales son un grupo de proteínas que comparten alta homología en algunos bivalvos marinos, se cree que están implicadas en la defensa del huésped. Una de las principales proteínas plasmáticas llamada dominina, se ha purificado y caracterizada en la ostra *C. virginica* (Itoh *et al.*, 2011). La secuencia de aminoácidos de dominina es similar a cavortina de la ostra *C. gigas* (Scotti *et al.*, 2007); a pernina del mejillón *Perna canaliculus* (Scotti *et al.*, 2001), y a una proteína marcada como la superóxido dismutasa extracelular de la ostra *S. glomerata* (Green *et al.*, 2009). Se cree que dominina y sus homólogos son proteínas multifuncionales que posiblemente están implicados en antioxidación, reparación de heridas, transporte de metal y mineralización, además de en el sistema inmune. Aunque la expresión de genes dominina aumenta tras la exposición a *P. marinus*, su papel de defensa aún no está claro (Itoh *et al.*, 2011). En las almejas *Mya arenaria* y *Mercenaria mercenaria* se han aislado proteínas similares (Abebe *et al.*, 2007).

#### 1.2.4.12 Histonas

Las histonas contribuyen a la respuesta inmune innata ya que poseen actividad antimicrobiana, su expresión aumenta en la respuesta inmune y son capaces de unirse a LPS y otros PAMPs para eliminar diversos patógenos (Nikapitiya & Dorrington, 2013). Un estudio en *C.*



*virginica* indicó que la histona H4 podría estar implicada en la defensa de la ostra contra la actividad bacteriana (Dorrington *et al.*, 2011).

#### 1.2.4.13 Inhibidor de metaloproteinasa de tejidos (TIMP)

Los componentes de la matriz extracelular de eucariotas controlan la diferenciación celular, el comportamiento y el destino celular, debido a que cambian e interaccionan constantemente. Las enzimas implicadas en este proceso son la familia de metaloproteinasas de matriz (MMPs) cuya actividad está controlada por los inhibidores de metaloproteinasas (TIMPs). Los componentes de la matriz extracelular sirven como lugares de acoplamiento para la invasión de patógenos. Proteasas de varios patógenos como bacterias o protozoos activan MMPs latentes o inactivan TIMPs, contribuyendo a daños en el tejido y destruyendo las barreras para una mejor expansión del patógeno. TIMP es un factor importante en la curación de heridas y otros mecanismos de defensa en la ostra *C. gigas*. La expresión del transcrito en hemocitos aumenta como respuesta a sustancias secretadas/excretadas por bacterias, probablemente proteasas o MMPs (Montagnani *et al.*, 2007).

#### 1.2.4.14 Quitinasa

El polímero de quitina es una repetición de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina que se encuentra abundantemente en los intertegumentos de nematodos, moluscos, hongos y protozoos, entre otros. Las enzimas quitinasas poseen un papel importante en la regulación del crecimiento y remodelación de este polímero, y podrían tener un rol fundamental en la defensa y degradación de patógenos poseedores de quitina. En *C. gigas* el transcrito de un homólogo de quitinasa está sobreexpresado en hemocitos como respuesta a estímulos bacterianos (Badariotti *et al.*, 2007).

Recientemente, se ha caracterizado un efector antimicrobiano con dominios de unión a quitina en *Mytilus coruscus* (Qin *et al.*, 2014). Su expresión aumenta considerablemente en respuesta al enfrentamiento

bacteriano; en la región C-terminal presenta un precursor homólogo a quitinasa responsable de la actividad antimicrobiana. Se cree que hay una alta incidencia de dominios de unión a quitina en bivalvos; en el genoma de ostra se encontraron 76 proteínas con dicha característica (Gerdol & Venier, 2015).

#### 1.2.4.15 Proteasas e inhibidores de proteasas

Las proteasas son enzimas con funciones reguladoras en diferentes procesos fisiológicos, entre otros en la coagulación (Takada *et al.*, 1994), la inflamación (Hiemstra, 2002) y la respuesta inmune (Gorman *et al.*, 2000). Las proteasas no solo están presentes en bivalvos, sino también en organismos patógenos, que las utilizan como herramientas de protección contra los mecanismos defensivos del hospedador; siendo capaces de modular la inmunidad del hospedador en diferentes niveles, desde el reconocimiento de los receptores a los efectores inmunes (Donnelly *et al.*, 2011). Estas proteínas facilitan la invasión del patógeno entre los tejidos del hospedador y pueden llegar a reducir la actividad lisozima y aglutinante del hemocito (La Peyre *et al.*, 1996), así como causar alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular (Paynter *et al.*, 1995). Para contrarrestar estos efectos existen proteínas denominadas inhibidores de proteasas (PI) que se centran en la lucha contra los organismos patógenos para evitar su propagación (Armstrong, 2006). En bivalvos, se han detectado inhibidores de proteasas en las ostras *C. gigas* y *C. virginica*, en la ostra perlífera *P. fucata* (La Peyre *et al.*, 2010; Montagnani *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2006; D. Zhang *et al.*, 2013), algunos de ellos implicados en la defensa contra protozoos parásitos, y en las vieiras *A. irradians* y *C. farreri* (Wang *et al.*, 2009b; Zhu *et al.*, 2006).

#### 1.2.4.16 Proteínas plasmáticas relacionadas con $\text{Fe}^{+2}$

Extracelularmente el  $\text{Fe}^{+2}$  se une a la transferrina, en el medio intracelular el hierro se une a la ferritina. La lactoferrina está relacionada con la transferrina y se encuentra en los lisosomas. La



competencia por el hierro entre el patógeno y la célula huésped influye en el desenlace de la infección. Se ha demostrado que la cavortina, proteína plasmática de ostras *C. virginica*, es capaz de secuestrar hierro limitando la disponibilidad de este metal esencial para los patógenos, lo que sugiere un posible papel en los mecanismos de defensa del hospedador (Itoh *et al.*, 2011). Se ha observado que la presencia de transferrina y lactoferrina en los medios de cultivo del parásito *P. marinus* inhibe su crecimiento (Gauthier *et al.*, 1995; Gauthier & Vasta, 1994). En la almeja *M. mercenaria* se observaron diferencias en el nivel de expresión de la ferritina dependiendo de la susceptibilidad o resistencia a bacterias (Perrigault & Allam, 2012).

#### 1.2.4.17 Bactericidas o proteínas que aumentan la permeabilidad (BPIs)

Bactericidas o proteínas que aumentan la permeabilidad (BPIs) son proteínas conservadas en la evolución y presentes en los moluscos capaces de unirse a LPS y causar la destrucción bacteriana por aumento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática bacteriana. En bivalvos se han identificado proteínas bactericidas en *C. gigas* (Gonzalez *et al.*, 2007b) y en *Scapharca broughtonii* (Mao *et al.*, 2013).

### 1.2.5 Procesos celulares con especial importancia en el sistema inmune

Existen una serie de mecanismos celulares imprescindibles para el buen funcionamiento y la homeostasis de los seres vivos, dichos procesos también son de vital importancia en la respuesta inmune de bivalvos.

#### 1.2.5.1 Muerte celular programada (PCD)

La muerte celular programada (PCD: Programmed cell death) juega un papel importante en la eliminación de células dañadas o perjudiciales y en el funcionamiento normal del organismo,

incluyendo el desarrollo embrionario, la morfogénesis de los tejidos y los procesos patológicos (Vaux & Korsmeyer, 1999). El proceso más estudiado de PCD es la apoptosis, aunque éste no es el único tipo de PCD en los organismos multicelulares; existen otras formas altamente conservadas de PCD como la necrosis o la autofagia (Edinger & Thompson, 2004; Walsh & Edinger, 2010).

#### 1.2.5.2 Apoptosis

Dentro de las diferentes funciones defensivas de las células inmunes de moluscos, la muerte celular programada apoptótica o apoptosis tiene una especial interés por su papel de gran importancia en la adecuada eliminación de células infectadas o dañadas (Terahara & Takahashi, 2008). Este proceso se describe como aquella forma de PCD que elimina células dañadas o superfluas de manera controlada, minimizando el daño y la disrupción a las células vecinas y que es vital para el desarrollo embrionario, sistema inmune y homeostasis de los tejidos (Repnik & Turk, 2010). Durante el proceso apoptótico no tienen lugar reacciones inflamatorias asociadas a la apoptosis propiamente dicha, ni tampoco durante la eliminación de las células apoptóticas, debido a que éstas no liberan los constituyentes celulares al tejido intersticial que la rodea, porque son fagocitadas rápidamente por las células circundantes previniendo así una necrosis secundaria. Además, las células ingeridas no producen citoquinas anti-inflamatorias (Savill & Fadok, 2000). La apoptosis está definida por una serie de cambios morfológicos que afectan a una única célula o pequeños grupos celulares (Elmore, 2007) que son consecuencia de una serie de cambios moleculares y bioquímicos propios del proceso apoptótico.

La apoptosis juega un papel clave en la defensa de moluscos contra parásitos protozoos, patógenos y en procesos de toxicidad ambiental causada por diferentes contaminantes y sustancias tóxicas (Kiss, 2010; Schaumburg *et al.*, 2006; Sokolova, 2009). Al ser un proceso inmunológicamente silencioso, que no induce inflamación, se piensa que la apoptosis de las células infectadas puede amortiguar la

propagación del patógeno y proteger la integridad de los tejidos circundantes mediante la limitación de la inflamación potencialmente perjudicial (Birge & Ucker, 2008; Sokolova, 2009).

Los hemocitos de *C. gigas* muestran una inducción de la apoptosis durante la fagocitosis de bacterias *Planococcus citraeus*. El proceso de apoptosis se relaciona con el estallido respiratorio de hemocitos, sugiriendo que la apoptosis puede estar inducida por el daño oxidativo sufrido en los hemocitos durante la eliminación de patógenos fagocitados (Terahara & Takahashi, 2008). Gervais *et al.* 2016 sugieren que el contacto de los hemocitos de la ostra *O. edulis* con el parásito *Bonamia ostreae* induce una respuesta específica que activa la vía de apoptosis. En *C. gigas* se produce un incremento de la apoptosis como consecuencia de la infección por el parásito intracelular *P. marinus*, que posteriormente retorna a niveles basales, lo que podría deberse a una inhibición del proceso por parte del parásito (Foster *et al.*, 2011; Sokolova, 2009). La infección por *P. marinus* resulta en una activación de la apoptosis más rápida en los hemocitos de ostras derivadas de cepas resistentes al parásito que en las ostras susceptibles, lo que sugiere que una rápida inducción de apoptosis podría ser un mecanismo defensivo efectivo contra el protozoo (Goedken *et al.*, 2005). Morga *et al.* 2012, relatan la posible inhibición de la apoptosis por parte de *B. ostreae* en los hemocitos de *O. edulis*, mecanismo de gran importancia en la defensa del hospedador contra el parásito (Gervais *et al.*, 2016).

Sin embargo, la apoptosis no es el único tipo de la muerte celular programada en los organismos multicelulares, existen otras formas altamente conservadas de PCD como la necrosis o la autofagia (Edinger & Thompson, 2004; Walsh & Edinger, 2010).

#### 1.2.5.3 Necrosis

La necrosis se define como una forma de muerte celular pasiva, es el resultado de una catástrofe bioenergética que provoca la disminución del ATP hasta reducirse a niveles incompatibles con la supervivencia celular (Edinger & Thompson, 2004). Al contrario de la

apoptosis, proceso controlado y regulado, en la necrosis se producen una serie de eventos no controlados que provocan graves daños irreversibles. Se origina a partir de perturbaciones ambientales con liberación incontrolada de contenido celular inflamatorio al tejido circundante, en dicho proceso la célula sufre daños, resultando en una pérdida de la integridad de la membrana plasmática, vacuolización del citoplasma, hinchazón o inflamación y trastorno celular (Edinger & Thompson, 2004).

#### 1.2.5.4 Autofagia

La muerte celular por autofagia lleva asociada la degradación celular por lisozimas internas (Bursch, 2001). Existen importantes conexiones entre la muerte celular apoptótica y la autofágica dado que ocurren de manera simultánea en muchos procesos. Consiste en el paso por parte de las células, a un programa catabólico en el que tiene lugar la degradación de constituyentes celulares con el objetivo de producir energía como un mecanismo de supervivencia durante periodos de estrés nutricional (Edinger & Thompson, 2004). La célula puede secuestrar orgánulos dañados y proteínas de vida larga que son encapsulados en una vacuola bicapa autofágica denominada autofagosoma. Posteriormente, las moléculas son transportadas a los lisosomas donde tendrá lugar la degradación y reciclaje enzimático.

#### 1.2.6 Inmunomodulación neuroendocrina (NEI)

La red reguladora NEI consiste en la existencia de una red de retroalimentación unificada entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune. Recientemente se ha conocido el sistema NEI en ostras, capaz de modular la respuesta inmune a través del sistema "hemocito-nervioso" mediado por una vía similar al eje inmunomodulador neuroendocrino (NIA) (Liu *et al.*, 2016a, 2017), a la que pertenecen varias hormonas, neurotransmisores, enzimas clave y receptores identificados en dichos bivalvos. Además, se ha demostrado que los moluscos son los animales más primitivos con un sistema NEI completo (Liu *et al.*, 2016a).

### 1.2.6.1 Inmunomodulación catecolaminérgica

El sistema neuroendocrino catecolaminérgico se compone principalmente de catecolaminas (CA), enzimas metabólicas de CA y receptores de CA (Kvetnansky *et al.*, 2009). Las CA, familia a la que pertenecen la dopamina (DA), la norepinefrina (NE) y la epinefrina (EN), son uno de los primeros neurotransmisores aparecidos durante la ontogénesis de las larvas de ostra; y actúan como señal de regulación en proliferación celular, diferenciación y neurogénesis en etapas de desarrollo más tempranas (Z. Zhou *et al.*, 2012). En ostras adultas, la síntesis y liberación de CA se ha estudiado en hemolinfa, manto y branquias (Lacoste *et al.*, 2001b, 2002). Tres importantes enzimas metabólicas de catecolaminas, dopa decarboxilasa (DDC), fenilalanina hidroxilasa (PAH) y monoaminoxidasa (MAO), así como homólogos de los receptores adrenérgicos  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  se han identificado en ostras (Boutet *et al.*, 2004c; Aladaileh *et al.*, 2008; B. Yang *et al.*, 2012; McDowell *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016a). Estos resultados sugieren que la ostra posee un sistema neuroendocrino catecolaminérgico completo que es estructuralmente similar a los de organismos superiores.

La regulación inmune bajo estrés biótico y abiótico es una de las actividades más importantes moduladas por las CA durante las etapas larvarias de la ostra (Liu *et al.*, 2015b). NE presenta efectos negativos sobre la apoptosis de hemocitos y la fagocitosis a través de los receptores de hemocitos de ostra (Lacoste *et al.*, 2001b; Liu *et al.*, 2016a, 2017). Por ejemplo, el tratamiento con NE disminuye el contenido total de proteínas y las actividades de PAH y fosfatasa ácida en la ostras *S. glomerata* (Aladaileh *et al.*, 2008). NE se asocia con una mayor susceptibilidad a la infección bacteriana en la ostra adulta *C. gigas* (Adamo, 2008). NE modula la producción de especies reactivas de oxígeno en hemocito a través de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en *C. gigas* (Lacoste *et al.*, 2001b, 2002). Además, una red completa relacionada con el sistema inmune que comprende PRRs, receptores intracelulares, transductores de señalización y efectores inmunes está modulada por NeurimmiRs sensibles a NE (microARN que interactúan con el sistema NEI), indispensable para

que los hemocitos de ostra respondan al estrés y la infección (Chen *et al.*, 2015).

#### 1.2.6.2 Inmunomodulación colinérgica

La acetilcolina (ACh) es un importante neurotransmisor del sistema nervioso colinérgico sintetizado por la colina acetiltransferasa (ChAT) e hidrolizado por la acetilcolinesterasa (AChE) (Deiana *et al.*, 2011). En los últimos años, el sistema nervioso colinérgico se ha identificado en bivalvos (Shi *et al.*, 2012, 2014, 2015). Las actividades enzimáticas de AChE se han observado en la lisis hemocítica de *C. gigas* y en tejidos, incluidas branquias, manto, intestino y músculo de *C. hongkongensis* (Zha *et al.*, 2013). Además, se ha identificado un homólogo del receptor de ACh muscarínico (CgmAChR) de *C. gigas*, y su ARNm está ampliamente distribuido en diversos tejidos (Liu *et al.*, 2016a). Estas evidencias demuestran la existencia de la vía colinérgica antiinflamatoria en la ostra. El sistema neuroendocrino colinérgico se puede activar mediante estimulación inmune y tiende a regular negativamente la respuesta inmune a una escala de tiempo prolongado (Liu *et al.*, 2016a). En *C. gigas*, ACh influye en la expresión del ARNm de: TNF, factores de transcripción AP-1 y NF- $\kappa$ B, así como en la apoptosis y fagocitosis de hemocitos (Liu *et al.*, 2016b). CgmAChR, funciona en el sistema inmunitario neuroendocrino colinérgico y contribuye a la regulación de la expresión de TNF y al proceso de apoptosis (Liu *et al.*, 2016c). ACh lleva a cabo una regulación sinérgica junto con neurotransmisores como encefalina (ENK) durante la respuesta inmune; CgmAChR se une rápidamente a ENK en una etapa temprana para la eliminación de patógenos invasores, pero luego se une a ACh en lugar de a ENK durante las últimas etapas para evitar la hiperinmunidad (Liu *et al.*, 2017). Además, se ha comprobado que un microARN (miARN) de *C. gigas* reprime la síntesis/liberación de ACh y la absorción de colina en hemocitos durante la etapa temprana de la infección por *Vibrio* (Chen *et al.*, 2016).



### 1.2.6.3 Inmunorregulación del sistema nítrico oxidasa

El óxido nítrico (NO) es una importante molécula de señalización involucrada en una amplia gama de procesos fisiológicos, entre los que destaca la defensa inmune (Bogdan *et al.*, 2000; Bogdan, 2001). En ostras, el parásito protozoario *P. marinus* podría activar la respuesta al NO tanto in vitro como in vivo, indicando que NO participa en la defensa de *C. virginica* ante la infección experimental con *P. marinus* (Villamil *et al.*, 2007). NOS es el miembro más importante en el sistema NO por su papel exclusivo en la síntesis *de novo* de NO; en ostras *C. gigas* se ha identificado una isoforma NOS (CgNOS) que se encuentra en los hemocitos (Jiang *et al.*, 2015). La coestimulación de LPS y TNF- $\alpha$  induce la translocación de CgNOS de la membrana al citoplasma de los hemocitos (Jiang *et al.*, 2016). Además, la inducción y la activación de CgNOS se inician mediante la activación de CgNF- $\kappa$ B y CgSTAT. Estos resultados sugieren que CgNOS es un antiguo NOS que ejerce todas las funciones asignadas a diversas las isoformas de NOS de mamíferos (Jiang *et al.*, 2016).

### 1.2.6.4 Inmunorregulación de neuropéptidos

Los neuropéptidos abarcan una clase diversa de moléculas de señalización celular que se producen y liberan a partir de neuronas a través de una vía secretora regulada (Stewart *et al.*, 2014). En el genoma de *C. gigas* se han identificado 64 genes de neuropéptidos, además hoy 300 precursores de péptidos bioactivos, incluidos tres precursores de neuropéptidos identificados recientemente PFGx8amida, RxIamida y Wx3Yamida, la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y dos hormonas ponedoras de huevos (ELH) (Zhang *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2014). Dos péptidos relacionados con GnRH (CgGnRH-A y CgGnRH-G) se caracterizan por espectrometría de masas a partir de extractos de ganglios viscerales de *C. gigas* (Bigot *et al.*, 2012). Además, se han detectado Leu-ENK y Met-ENK en hemocitos y hemolinfa de *C. gigas* (Liu *et al.*, 2008). Al igual que en vertebrados, los neuropéptidos identificados en la ostra juegan un papel importante en la regulación inmune. Leu-ENK regula

la actividad CAT y el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de la unión con receptores de neuropéptidos en *C. gigas* (Liu *et al.*, 2008). Durante la ontogénesis de la ostra, el sistema nervioso encefalinérgico regula las expresiones de factores inmunitarios, las actividades antibacterianas y de PO, así como la concentración de citoquinas a través del neurotransmisor Met-ENK (Liu *et al.*, 2015b). El receptor específico para Met-ENK puede modular funciones fagocíticas y antibacterianas de los hemocitos a través de los segundos mensajeros Ca<sup>2+</sup>V y cAMP, imprescindible para la eliminación de patógenos y el mantenimiento de la homeostasis en ostras (Liu *et al.*, 2015a). Existe una regulación sinérgica de ENK y ACh/NE; citoquinas y factores de transcripción como TNF, AP-1 y NF-κ $\epsilon$  desempeñan papeles importantes en la inmunomodulación de ENK/ACh/NE (Liu *et al.*, 2016a). Se hipotetiza que los hemocitos, como células inmunes, constituyen el eje neuroendocrinoimmune (NIA) "hemocito-nervioso" con el sistema nervioso para mediar la inmunomodulación neural en ostras (Liu *et al.*, 2017).

#### 1.2.6.5 Inmunorregulación GABAérgica

El sistema GABAérgico es un sistema neurotransmisor inhibitorio ubicuo que coopera con el sistema glutamatérgico excitatorio para ejercer un profundo efecto sobre el sistema nervioso y las células inmunes. Recientemente, se han identificado un homólogo de GAD (ácido glutámico descarboxilasa) (CgGAD) y GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) en ostras *C. gigas*. CgGAD se encuentra principalmente en granulocitos, mientras que GABA existe principalmente en hemolinfa. Ambas responden dinámicamente a la estimulación de LPS. CgGAD es capaz de promover la producción de GABA, y GABA podría inhibir notablemente la respuesta inmune estimulada por LPS, la concentración de NOS, la fagocitosis y las tasas de apoptosis de inmunocitos (Li *et al.*, 2016a, 2016b). Estos resultados demuestran en primer lugar que los neurotransmisores de aminoácidos existen en ostras y están implicados en la regulación inmune.



Las ostras han desarrollado un sistema NEI primitivo en la estructura pero complicado en función, que es similar al de vertebrados. Este sistema NEI participa en muchos procesos fisiológicos, especialmente en la regulación inmune de la ostra. Sin embargo, la información sobre el sistema NEI es todavía limitada, el sistema neuroendocrino es una red extremadamente complicada, y cualquier cambio leve puede tener consecuencias totalmente diferentes. Las investigaciones más exhaustivas y ecológicas serán críticas para una mejor comprensión de los patrones de regulación del sistema NEI (Wang *et al.*, 2018).



## 1.3 PROTEÓMICA

### 1.3.1 Proteínas, proteoma y proteómica

Las proteínas son moléculas orgánicas compuestas por aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos que adquieren una estructura tridimensional secundaria, terciaria y/o cuaternaria característica. Estas moléculas tienen un papel crucial en todos los organismos vivos, pudiendo actuar como enzimas catalizadoras de muchas reacciones químicas esenciales del metabolismo celular, o constituyendo el esqueleto o sistema de sostén de la célula y los tejidos, así como de diferentes estructuras subcelulares. También hay que resaltar el papel que juegan en el mantenimiento de la estructura del DNA y durante la transcripción y replicación del mismo. Además, las proteínas participan en motilidad, en señalización celular, actúan como hormonas en el sistema endocrino, como transportadoras en la sangre, como efectores en el sistema inmunitario, en mitosis y meiosis, entre otros. La importancia de las proteínas se ve resaltada por su participación en la mayoría de procesos y funciones celulares. Por tanto, las proteínas son esenciales para controlar las diversas funciones de los sistemas biológicos; no sólo a través de la ubicación y la cantidad, sino también a través de varias modificaciones posttraduccionales y de interacciones proteína-proteína (Diz *et al.*, 2012a).

El término proteoma fue acuñado por Wilkins *et al.* (1996) y se define como la dotación completa de las proteínas expresadas por el genoma de un organismo, tejido o célula en un momento dado. La proteómica es el campo desarrollado para estudiar el proteoma (Williams & Hochstrasser, 1997), el estudio a gran escala de las proteínas pertenecientes a un sistema biológico (Pandey & Mann, 2000), con el fin de obtener una visión global e integrada de los procesos celulares. La proteómica no sólo incluye la identificación y cuantificación de proteínas, sino también la determinación de sus localizaciones, modificaciones, interacciones, actividades y funciones (Fields, 2001; Schimpf *et al.*, 2009).

Los proteomas de células son extremadamente complejos, la mayoría de las actividades que ocurren en una célula son llevadas a cabo mediante proteínas, pudiendo llegar a contener varios miles de proteínas diferentes. Para caracterizar el proteoma de una célula, es importante tener en cuenta que el proteoma es dinámico siendo el reflejo del medio ambiente en el que es estudiado. Sus componentes varían entre organismos, tejidos, células u orgánulos y como respuesta a estímulos externos e internos pueden ser modificadas posttraduccionalmente, translocadas, sintetizadas o degradadas, por lo que obtener el proteoma de una célula es como tomar una fotografía de todas las proteínas en un momento determinado bajo una condición biológica determinada.

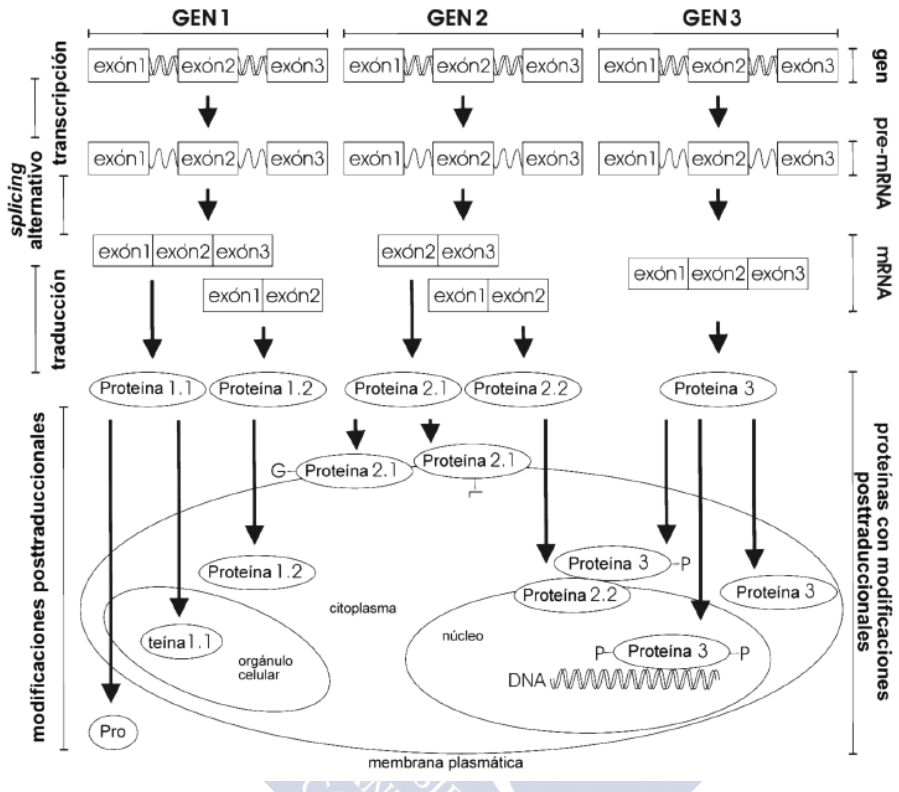
Aunque la secuencia de aminoácidos de una proteína esté definida por un gen concreto, la información genética por sí sola no puede contener la información completa concerniente a la misma. Así, los transcritos de mRNA procedentes del DNA que codifica proteínas pueden ser procesados siguiendo sitios de corte y empalme alternativos (o *splicing* alternativo), por lo que no existe una correlación directa entre los niveles de expresión del ARN (transcripción) y la expresión de proteínas (Gygi *et al.*, 1999). Además, las proteínas traducidas pueden ser modificadas químicamente en la célula según un procesamiento posttraduccional; se han documentado al menos unas 200 posibles modificaciones posttraduccionales diferentes, lo cual demuestra la existencia de un complejo entorno proteico dentro de la célula (Dziembowski & Seraphin, 2004). Las modificaciones posttraduccionales afectan a la estructura, ubicación, función, intercambio, activación, regulación, respuesta al medio ambiente y degradación de proteínas (Gygi *et al.*, 1999). Esta información esencial sólo se puede determinar mediante el estudio de proteínas y no de genes. La expresión de ARNm no revela la actividad de la proteína que codifica o sus posibles combinaciones o interacciones con otras proteínas que generan nuevas funciones (Abbott, 1999). Las modificaciones posttraduccionales generan una diversidad tremenda, la complejidad y heterogeneidad del producto del gen y su determinación es uno de los principales retos en la investigación proteómica. Considerando lo cual, podríamos decir que

un genoma puede dar lugar a un número infinito de proteomas. La evolución reciente de los estudios basados en espectrometría de masas para la determinación sistemática, cualitativa y cuantitativa de proteínas modificadas promete aportar nuevas ideas sobre la dinámica y el control espacio-temporal de las actividades de proteínas por modificaciones posteriores a la traducción, revelando así su papel en diversos procesos biológicos (Jensen, 2004; Kucharova & Wiker, 2014). La Figura 15 pretende ilustrar esquemáticamente la complejidad del proteoma celular.

La publicación del genoma humano y el de otros organismos ha demostrado algunos avances metodológicos claves que han contribuido al desarrollo de muchas disciplinas como la taxonomía, filogenia, la ecología y la evolución (Vasemägi & Primmer, 2005). Sin embargo, a pesar de una enorme inversión en la genómica humana, todavía existe una gran brecha en la predicción del fenotipo a partir del genotipo (Makowsky *et al.*, 2011). La necesidad de entender todos los pasos en la decodificación del mensaje del ADN explica el interés en la expresión génica y su regulación, por lo que ha habido un progreso paralelo a la revolución genómica, donde se ha incluido el análisis del transcriptoma (Ozsolak & Milos, 2011; Stapley *et al.*, 2010) y del proteoma (Diz *et al.*, 2012a). La razón fundamental para ello es el hecho de que el patrón proteico de una muestra biológica es mucho más informativo sobre el estado fisiológico de un organismo que su genoma, lo que subraya el papel muy prometedor de la proteómica en el futuro, ya que para entender completamente los mecanismos biológicos implicados en diferentes situaciones es necesario realizar un análisis proteómico (Kaji *et al.*, 2000; Diz *et al.*, 2012a).

Actualmente, la investigación en proteómica segrega a esta disciplina en tres campos principales: la proteómica de expresión, la proteómica funcional y la proteómica estructural.

La **proteómica de expresión** es el estudio cuantitativo de la expresión de proteínas, comparando muestras que difieren en alguna variable. La información obtenida puede permitir la identificación de



**Figura 15.** El proteoma es mucho más complejo que el genoma correspondiente. Esta figura pretende ilustrar el proteoma creado a partir de tres genes. En primer lugar los genes son transcritos a mRNA (Messenger-RNA) que puede ser cortado y empalmado en posiciones alternativas (o splicing alternativo). El mRNA resultante es traducido a proteínas que también pueden ser cortadas o procesadas según distintos tipos de modificaciones posttraduccionales. La localización de las proteínas y sus interacciones con otras proteínas o moléculas juega un importante papel en su funcionalidad. Las modificaciones posttraduccionales afectan, entre otras características, a la localización e interacción de las proteínas. (Imagen adaptada de Peng & Gygi 2001).

nuevas proteínas implicadas en transducción de señales, la identificación de proteínas específicas de una enfermedad etc.

La **proteómica funcional** es el estudio de la función de las proteínas dentro de un sistema biológico y la regulación de su expresión dentro de ese sistema. Las modificaciones

posttraduccionales sufridas por las proteínas tras la traducción afectan tanto a la estructura como a la función. La proteómica funcional incluye también el estudio de la afinidad entre la interacción ligando-receptor.

La **proteómica estructural** involucra la determinación y el análisis de estructuras tridimensionales de proteínas, las cuales contribuyen a su función y su identidad molecular con otras proteínas. La información acerca de la estructura 3D de una proteína es central para el diseño de pequeños compuestos que se unan a grupos funcionales, generando por ejemplo cambios en el sitio activo de una proteína. Actualmente, la industria es quien empuja al desarrollo de la proteómica estructural centrada en el descubrimiento de nuevas dianas de drogas.

### 1.3.2 Técnicas proteómicas

Hay una gran variedad de métodos, reactivos, instrumentación y herramientas informáticas disponibles para el diseño, la realización y el análisis de datos de experimentos proteómicos (Pandey & Mann, 2000; Stults & Arnott, 2005). En general, dichos experimentos suelen consistir en cuatro etapas básicas: 1) preparación de la muestra, 2) separación de las proteínas presentes, 3) análisis por MS y 4) análisis informático de los datos.

Podemos clasificar las técnicas de proteómica en:

Técnicas de Separación:

- Electroforesis unidimensional (1DE)
- Electroforesis bidimensional (2DE)
- Cromatografía líquida (LC)
- Cromatografía de afinidad (TAP) (*Tandem affinity purification*)

Técnicas de Tinción:

- Marcación posterior a la separación proteica: Plata, Sypro Ruby, Coomassie, Blue Coloidal.

- Marcación previa a la separación proteica: DIGE (Two-dimensional difference gel electrophoresis), iTRAQ (isobaric tag for relative & absolute quantitation), SILAC (Stable isotope labeling with amino acids in cell culture), o ICAT (isotope-code affinity tagging).

Técnicas de Identificación:

- Método de la huella peptídica con o sin datos de fragmentación de péptidos utilizando espectrometría de masas simple (MS) o en tándem (MS/MS o MS<sup>n</sup>).
- Secuenciación *de novo*.

### 1.3.3 Herramientas de separación en proteómica

En una visión global, dos estrategias principales se utilizan para separación proteica:

- Convencional: esta estrategia implica la separación de todas las proteínas presentes en una muestra por electroforesis bidimensional (2-DE), por lo general se continua con la identificación de proteínas de interés mediante espectrometría de masas (MS).
- Proteómica Shotgun: Se trata de la secuenciación de una mezcla compleja de péptidos utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). El uso de la proteómica *Shotgun* permite la identificación de un mayor número de proteínas rápidamente a partir de una sola muestra, proporcionando una imagen metabólica más completa de la función celular y la fisiología (Schiffman *et al.*, 2013).

#### 1.3.3.1 Electroforesis bidimensional 2-DE

La electroforesis bidimensional de alta resolución (2-DE), descrita por primera vez por Klose y O'Farrell (1975), es la técnica central en los estudios proteómicos y la base sobre la cual la proteómica se ha desarrollado, ya que ha demostrado ser la técnica



más poderosa para separar mezclas de proteínas de muy diverso origen biológico (Rabilloud, 2002). Este método abrió la puerta al estudio de un nuevo mundo de conocimiento: el funcionamiento detallado de las máquinas celulares (Anderson & Anderson, 1998). La electroforesis bidimensional permite la separación de cientos e incluso miles de proteínas en un único gel, dando lugar a un patrón nítido de marcas proteicas. Su elevado poder de resolución se basa en que la separación de las proteínas ocurre en base a dos parámetros fisicoquímicos independientes; el punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular (PM).

#### 1.3.3.1.1 Primera dimensión o Isoelectroenfoque (IEF)

En la primera dimensión se aplica una corriente eléctrica gracias a la cual las proteínas migran según su carga eléctrica en un gradiente de pH hasta alcanzar la posición en la que su carga neta es cero, es decir, su punto isoeléctrico (pI). En el isoelectroenfoque se establece un gradiente de pH formado por la distribución de anfolitos, moléculas anfotéricas pequeñas, solubles, con una alta capacidad buffer cerca de su pI. Estos anfolitos se encuentran co-polimerizados con una matriz de acrilamida inmovilizada en una tira con un gradiente de pH (IPGs, *Immobilized pH gradients*), estas tiras fueron desarrolladas por Bjellqvist *et al.* (1982), y permiten alta resolución y reproducibilidad de los geles.

El IEF es muy sensible a muchos compuestos presentes en muestras biológicas que pueden interferir en el proceso; por tanto, la preparación debe ser adaptada a cada tipo de muestra y es una de las variables más importantes dentro de la técnica de 2-DE (Rabilloud *et al.*, 2010). El proceso comienza con el cultivo o lisado de células, homogenizando tejidos para la extracción de las proteínas presentes, que deben estar completamente desagregadas y solubilizadas en la muestra con el fin de lograr una separación en la primera dimensión bien enfocada. Impurezas no proteicas pueden interferir en la separación y posterior visualización de los resultados 2-DE. Las sales, nucleótidos, fosfolípidos, polisacáridos, lípidos, compuestos fenólicos y material insoluble son los principales problemas para una correcta

visualización. En muestras marinas las sales deben eliminarse o mantenerse a una concentración tan baja como sea posible para evitar arrastre o problemas en el enfoque (Berkelman & Stenstedt, 2002). Las proteínas pueden ser desnaturalizadas por calor o a través de agentes químicos como la urea o distintos detergentes (Görg *et al.*, 2004; Molloy, 2000). Sin embargo, los detergentes generan un ruido de fondo que puede llegar a enmascarar señales específicas de origen peptídico, por lo que la cantidad de detergente presente en la muestra debe ser mantenida al mínimo o, alternativamente, ser diluida o eliminada de la muestra antes de su digestión enzimática y análisis por MS. En los últimos años los detergentes convencionales se han sustituido por CHAPS (3 - [(3-Colamidopropil) - dimetilamonio] - propanosulfonato), un detergente zwitteriónico que permite una mejor solubilización (Berkelman & Stenstedt, 2002). La urea se utiliza ampliamente como desnaturalizante; el uso de tiourea en adición a urea mejora la solubilización de la muestra, en particular de proteínas de membrana (Rabilloud, 1998). Una vez desnaturalizadas, las proteínas son además reducidas y alquiladas para prevenir su agregación a través de la formación de enlaces o puentes disulfuro entre los grupos tiol de dos cisteínas. El reductor más comúnmente utilizado es ditioneitol (DTT). Anfolitos portadores o tampón IPG se pueden incluir en la solución de muestra para mejorar la solubilidad de proteínas, reduciendo al mínimo la agregación de proteínas debido a las interacciones carga-carga (Berkelman & Stenstedt, 2002).

#### 1.3.3.1.2 Segunda dimensión o SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS)

En la segunda dimensión la corriente eléctrica hace que las proteínas migren según su peso molecular (PM) mediante la técnica SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (dodecil sulfato de sodio), *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*). La tira utilizada en el isoelectroenfoque o primera dimensión, es aplicada en forma transversal sobre el gel, que puede presentar distintos porcentajes de acrilamida, y la electroforesis se realiza sobre la muestra que fue previamente separada por punto

isoeléctrico. El SDS es un detergente aniónico que enmascara la carga propia de las proteínas, formando complejos aniónicos con una carga negativa estable por unidad de masa. El SDS también contribuye a la ruptura de uniones puente de hidrógeno y bloquea interacciones hidrofóbicas, ayudando así al desplegado de las proteínas, minimizando las diferencias en la forma molecular mediante la eliminación de las estructuras terciarias y secundarias (Berkelman & Stenstedt, 2002). Además del SDS, las proteínas son sometidas a la acción de un agente desnaturizante, por ejemplo urea, y de un agente reductor como el DTT. De esta manera los péptidos se solubilizan en estado desnaturizado. En la Figura 16 se representan esquemáticamente los pasos involucrados en la electroforesis bidimensional.

#### *1.3.3.1.3 Procedimientos de tinción*

Una vez finalizada la electroforesis se deben revelar las manchas correspondientes a las proteínas separadas. La elección del procedimiento de tinción es crítica. Existen varios métodos que difieren principalmente en la sensibilidad (límite de detección), el rango dinámico para la cuantificación, la compatibilidad con el posterior procesamiento para la identificación por espectrometría de masas y el coste.

Se han desarrollado varios métodos de tinción para visualizar las marcas proteicas o "spots" en los geles producidos por SDS-PAGE; los procedimientos más utilizados son: tinción de plata, azul de Commassie y fluorescencia Sypro Ruby, todos presentan alta sensibilidad, pero sólo los 2 últimos permiten un análisis cuantitativo (con ellos, la intensidad de coloración es proporcional a la concentración de proteínas en la marca proteica) (Patton, 2000).

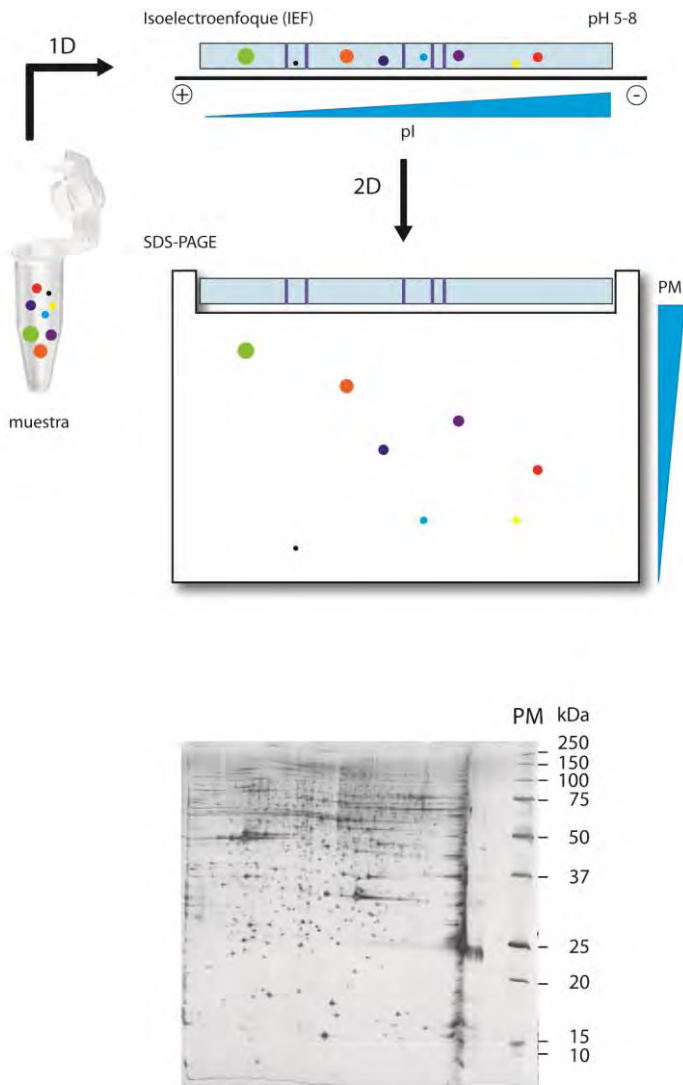
La tinción de plata, a pesar de ser la técnica con mayor sensibilidad en la detección proteica, con un límite de detección de 0,1 ng de proteína por marca proteica, tiene algunas desventajas tales como la mala reproducibilidad, rango dinámico limitado, y que al no ser una tinción lineal, no permite un análisis cuantitativo de la

concentración proteica en cada marca proteica, debido a la compleja naturaleza de la etapa de desarrollo de color y a la diferente sensibilidad a la plata entre las distintas proteínas (Gorg *et al.*, 2000; Steinberg, 2009), por lo tanto, con este tipo de tinción sólo es posible un análisis cualitativo.

La tinción de Coomassie es compatible con análisis cuantitativo, muy reproducible y de excelente compatibilidad con la espectrometría de masas (MS), pero es 50 veces menos sensible que la tinción de plata. Tras algunas modificaciones en esta tinción se ha desarrollado el azul de Coomassie G-250, con una sensibilidad más próxima a la tinción de plata, de hasta 1 ng de proteína por cada marca proteica (Candiano *et al.*, 2004).

La tinción con colorante fluorescente como el Sypro Ruby tienen un mayor rango dinámico, buena sensibilidad (0,5-1 ng por marca proteica) y compatibilidad con MS, pero la extracción de las marcas proteicas diferenciales es dificultosa y el escáner necesario para su lectura es costoso (Candiano *et al.*, 2004; Gorg *et al.*, 2000).

Aun teniendo en cuenta los distintos parámetros que definen a cada una de estas tinciones, todas comparten la desventaja de que es necesario realizar un gel independiente para cada muestra en estudio (control vs. tratamiento). Esto genera una menor reproducibilidad gel a gel debido a variaciones técnicas que puedan ocurrir durante las dos dimensiones (diferencias de polimerización en geles de poliacrilamida, fluctuaciones térmicas, concentración de sales, variaciones de pH o campo eléctrico, variaciones en la tinción), lo cual hace muy dificultosa la posterior comparación entre geles en la búsqueda de proteínas expresadas diferencialmente.



**Figura 16.** Esquema general de la 2-DE y un gel representativo del resultado real teñido con plata. 1D: Primera dimensión. 2D: Segunda dimensión. pI: punto isoelectrico. PM: peso molecular en kiloDaltons. kDa: kiloDaltons.

Las imágenes de gel pueden compararse con diferentes softwares comerciales, tales como PD Quest (BioRad Laboratories), Proteamweaver (BioRad Laboratories), DeCyder (GE Healthcare), SameSpots (Dinámica no lineal), Melanie (Bioinformática de Ginebra) o servicios específicos como Ludesi (<http://www.ludesi.com>).

Para completar el estudio proteómico, las marcas proteicas de interés pueden ser escindidas de los geles con el fin de identificar las proteínas mediante espectrometría de masas (MS) y búsqueda en bases de datos (Godovac-Zimmermann & Brown, 2001; López, 2007).

La 2-DE presenta diversas ventajas que explican su popularidad en los estudios proteómicos. Entre otras destaca el hecho de que permite realizar una visualización directa del mapa de proteínas del proteoma estudiado en determinadas condiciones, a diferencia de los métodos de fraccionamiento cromatográfico. Ello permite la fácil identificación de isoformas proteicas y sus modificaciones posttraduccionales, así como la comparación con otros mapas proteicos existentes en las bases de datos. La resolución de los geles 2-DE es suficiente para detectar unas 2.000 proteínas de manera rutinaria, pero el uso de geles de electroforesis de gran tamaño, así como la múltiple superposición de distintos gradientes de pH inmovilizados (IPGs), permiten la identificación de entre 5.000 y 10.000 proteínas (Görg *et al.*, 2004; Wittmann-Liebold *et al.*, 2006). El desarrollo de los IPGs eliminó gran parte de las limitaciones que presentaban los geles 2-DE basados en anfolitos portadores, tales como la baja reproducibilidad o la dificultad de detección de proteínas muy ácidas, básicas o de baja abundancia (Bjellqvist *et al.*, 1982; Görg *et al.*, 2004). A pesar de ser una técnica poderosa con grandes ventajas presenta algunas limitaciones como la difícil visualización de proteínas con pI extremos (con pH por debajo de 3 y por encima de 10), y proteínas prácticamente indetectables como las hidrófobas de membrana y las que se encuentran en menos de 1000 copias por célula (Gorg *et al.*, 2000; Wilkins & Appel, 2007).

### 1.3.3.2 Gel de electroforesis de dos dimensiones diferencial (2D-DIGE)

El gran aporte de la tecnología DIGE (*Difference gel electrophoresis*) en el área de la proteómica en comparación con las técnicas de tinción post-electroforesis, radica en la capacidad de la técnica de separar 2 muestras en un mismo gel eliminando de esta manera la variabilidad experimental inter-gel. Por otro lado, se pueden detectar diferencias en la abundancia de las proteínas en un rango mucho más amplio dado que la detección basada en fluorescencia tiene un mayor rango dinámico (Tonge *et al.*, 2001). Las proteínas pertenecientes a cada muestra biológica comparadas mediante 2D-DIGE son premarcadas con colorantes fluorescentes de la familia de la cianina (Cy3, Cy2, Cy5); de acuerdo a un diseño experimental adecuado. Las muestras problema (control vs. tratamiento) se marcan con Cy3 o Cy5, mientras que el colorante Cy2 es utilizado para marcar el estándar interno, pool que consiste en la mezcla de las dos muestras problema y asegura que todas las proteínas presentes en el experimento estén representadas permitiendo una comparación intra- y/o inter-gel a posteriori. A continuación se realiza una electroforesis bidimensional de las muestras en un mismo gel y se escanea en 3 longitudes de onda distintas, obteniendo así una imagen para cada muestra y otra para el estándar interno (Figura 17). La técnica permite la comparación de las muestras con la ventaja de evitar la variación entre geles pero comparte limitaciones clásicas con la técnica 2-DE con respecto a los extremos de pI, rango de PM y proteínas de membrana hidrófobas (Kusmann *et al.*, 2006; Lilley & Friedman, 2004).



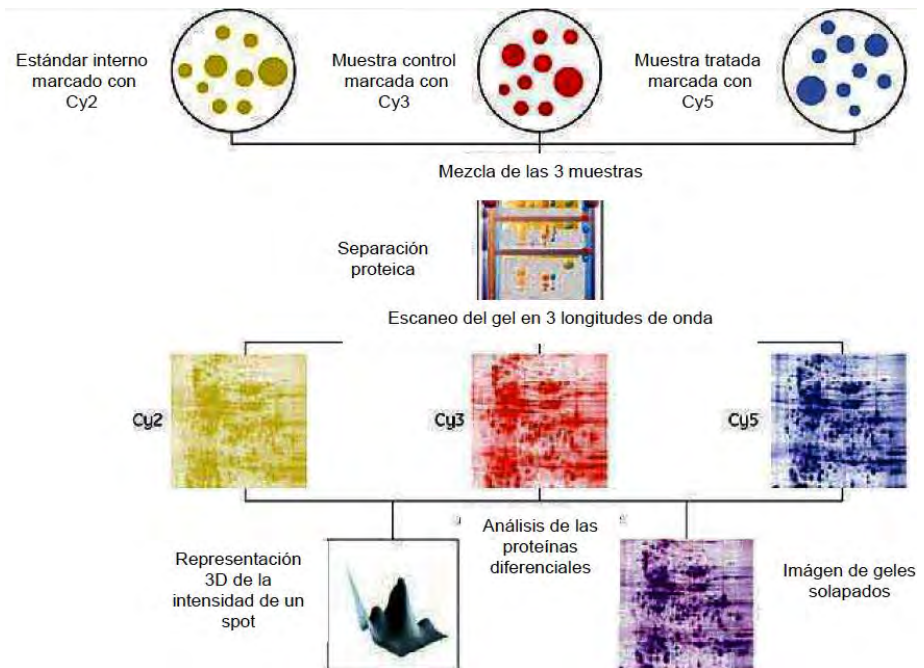


Figura 17. Esquema general del flujo de trabajo en la técnica DIGE.

### 1.3.3.3 Shotgun

*Shotgun* es una estrategia conceptualmente distinta que implica utilizar mezclas complejas de proteínas o de hecho todo un proteoma, y digerir todas las proteínas a péptidos con endoproteinasas de especificidad conocida. La mezcla resultante de péptidos se analiza a continuación, utilizando cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Los datos de los fragmentos peptídicos se comparan con bases de datos de secuencias para determinar las proteínas presentes en la muestra (Wilkins & Appel, 2007).

*Shotgun* es una estrategia muy dinámica; diferentes diseños son posibles dependiendo de las necesidades del investigador y propiedades de la muestra, que básicamente se pueden dividir en

técnicas *shotgun* con o sin marcaje. La elección de la opción más apropiada es un paso crítico a la hora de realizar un experimento.

- Con marcaje: ICAT (*isotope-code affinity tagging*) e iTRAQ (*isobaric tag for relative & absolute quantitation*) son técnicas donde las muestras se etiquetan con diferentes marcajes y se agrupan para ser analizadas por LC-MS/MS (Silberring & Ciborowski, 2010). SILAC (*Stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) es una técnica basada en espectrometría de masas que detecta diferencias en la abundancia de proteínas entre muestras utilizando marcaje isotópico no radiactivo (Everley *et al.*, 2004).
- Sin marcaje: se utiliza para estudiar todo el proteoma de una muestra o especie. Todas las proteínas se secuencian por LC-MS/MS que permite el estudio de varias réplicas sin el costo adicional del etiquetado (Schiffman *et al.*, 2013).

La creciente popularidad del fraccionamiento basado en la cromatografía es consecuencia de su capacidad para superar algunas de las limitaciones de los métodos basados en la 2-DE, permitiendo de este modo el estudio de ciertas proteínas difíciles de abordar mediante 2-DE, incluyendo las de membrana o las de baja abundancia (Peng & Gygi, 2001; Washburn *et al.*, 2001). La razón reside en que en la 2-DE las proteínas se separan para ser posteriormente digeridas, mientras que en la cromatografía multidimensional son primero digeridas a péptidos y después fraccionadas. Además, la cromatografía multidimensional permite el análisis automatizado y simultáneo de un mayor número de muestras que la 2-DE. La resolución de la cromatografía multidimensional es tan buena como la de la 2-DE, permitiendo la identificación de más de 1.000 proteínas.

Tanto el fraccionamiento basado en la 2-DE como en la cromatografía presentan ventajas y desventajas y el método tiene que ser seleccionado cuidadosamente para cada tipo de muestra y estudio. Además, estos métodos pueden ser utilizados paralelamente,

obteniéndose resultados complementarios (Amelina *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006; Kubota *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2006, 2004).

### 1.3.4 Espectrometría de Masas (MS)

En los estudios de proteómica de expresión la identificación de proteínas es esencial dado que es el primer paso para estudios posteriores que suponen en última instancia la caracterización funcional. Debido a su rapidez, elevada sensibilidad y gran variedad de aplicaciones, la espectrometría de masas se ha convertido en el método de elección para la identificación de proteínas a gran escala. Además permite la caracterización de modificaciones postraduccionales que presentan relevancia fisiológica como la glicosilación y fosforilación. En el campo de la proteómica, los espectrómetros de masas son utilizados en tres áreas mayoritarias: 1) para identificar proteínas, 2) para detectar sus modificaciones covalentes, incluyendo las modificaciones postraduccionales y 3) para caracterizar y como control de calidad de las proteínas recombinantes (Mann *et al.*, 2001).

La espectrometría de masas es un método analítico basado en la producción de iones en fase gaseosa de una mezcla de biomoléculas y la separación de los mismos en un analizador de acuerdo a su relación masa/carga ( $m/z$ ). Los iones así separados son detectados en función de su abundancia (de Hoffmann & Stroobant, 2007). Por tanto un espectrómetro de masas siempre debe realizar los siguientes procesos: I) producir iones de la muestra en la fuente de ionización; II) separar estos iones en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) en el analizador de masas; III) fragmentar los iones seleccionados y analizar los fragmentos en un segundo analizador; IV) detectar los iones que salen del último analizador y medir su abundancia con el detector que convierte los iones en señales eléctricas; V) procesar las señales del detector que se transmiten al ordenador (de Hoffmann & Stroobant, 2007). Para lograr la formación, separación y detección de estos iones, los espectrómetros de masas deben poseer al menos tres elementos: fuente de ionización, analizador de masas y detector.

#### 1.3.4.1 Fuente de ionización

Convierte al analito presente en fase líquida o sólida a iones en fase gaseosa para permitir el análisis, la fragmentación y la detección (Wilm, 2011). Dependiendo del tipo de ionización se obtienen iones con carga positiva o negativa y con una única carga o múltiples cargas. Existen varios métodos de ionización, pero los métodos más comúnmente utilizados en proteómica son Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI) y de ionización por electrospray (ESI) (Hernández *et al.*, 2007).

##### *1.3.4.1.1 Desorción / ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI):*

Los iones son generados por excitación con un láser pulsante (Karas & Hillenkamp, 1988). La muestra se cocrystaliza con un exceso de un compuesto orgánico denominado matriz, que contiene grupos químicos con alta capacidad de absorber luz UV. La matriz absorbe fotones emitidos por el láser y pasa a un estado electrónicamente excitado desde el que transfiere energía a las biomoléculas, las cuales se ionizan con una carga simple y pasan a la fase gaseosa (Hernández *et al.*, 2007).

##### *1.3.4.1.2 Ionización por electrospray (ESI):*

En una fuente ESI, la muestra se presenta al espectrómetro de masas en una forma líquida a presión atmosférica, donde se le aplica un potencial eléctrico que conduce a una pulverización fina de gotitas altamente cargadas debido a la repulsión electrostática que se dirige a través de un flujo en contracorriente de gas caliente, incrementando la concentración de carga en la superficie de las gotitas. A medida que la carga eléctrica alcanza un estado crítico, las pequeñas gotas explotan en partículas más pequeñas y con carga inferior. Este proceso de reducción y explosión se repite hasta que no quedan moléculas de analito cargadas individualmente. Generalmente, se genera una mezcla de iones de una y múltiples cargas. Dado que la muestra se introduce

en un estado líquido a presión atmosférica, las fuentes ESI pueden ser fácilmente asociados con técnicas de separación en fase líquida en línea, tales como la cromatografía líquida (Hernández *et al.*, 2007).

#### 1.3.4.2 Analizador de masas

Su función es separar los iones en fase gaseosa de acuerdo a su relación individual  $m/z$  (March, 2009). Los analizadores de masas más comúnmente utilizados son el cuadrupolo (*Quadrupole*), el de tiempo de vuelo (TOF, *Time-Of-Flight*), de trampa iónica (IT, *Ion Trap*), de resonancia ciclotrónica de iones con Transformada de Fourier (FTICR, *Fourier transform ion cyclotron resonance*) o de trampa orbital (Orbitrap), y pueden emplearse tanto de manera individual como en tándem. Entre ellos, uno de los más utilizados en combinación con la ionización tipo MALDI es el denominado tiempo de vuelo o TOF, que consiste en un tubo de una longitud fija sometido a una diferencia de voltaje tal que los iones vuelan a través de él según su relación  $m/z$ . A mayor  $m/z$  los iones vuelan más rápido y llegan antes al detector (Hernández *et al.*, 2007). En la modalidad en tándem (MS/MS) se pueden llevar a cabo múltiples pasos de análisis mediante distintos analizadores individuales separados en el espacio o en el tiempo. En la MS/MS separada en el espacio, los analizadores están físicamente separados, pero estrechamente conectados con el fin de mantener el vacío a lo largo de todo el recorrido de los iones. Este tipo de configuraciones se observa en instrumentos como el Q-TOF, TOF-TOF, QqQ (o triple cuadrupolo), etc. Por otra parte, la MS/MS separada en el tiempo puede llevarse a cabo con iones atrapados en una misma cámara con distintas etapas de análisis a lo largo del tiempo. Este tipo de procesos se pueden llevar a cabo con analizadores tipo IT, FTICR u Orbitrap.

#### 1.3.4.3 Fragmentación

El paso de la fragmentación de un ión precursor es un punto clave ya que permite el análisis de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), donde se producen dos o más separaciones secuenciales de iones generalmente con el acoplamiento de dos o más analizadores de

masas (El-Aneed *et al.*, 2009; Glish & Vachet, 2003). Los métodos de fragmentación más comunes utilizados en proteómica son: la disociación inducida por colisión (CID) (Haddon & McLafferty, 1968), la disociación de captura de electrones (ECD) (Zubarev *et al.*, 1998) y la disociación de transferencia de electrones (ETD) (Syka *et al.*, 2004).

#### 1.3.4.4 Detector

Es el encargado de detectar los iones que salen del último analizador y medir su abundancia al convertir los iones en señales eléctricas, la magnitud de la corriente producida es proporcional a su abundancia y al valor  $m/z$  del ión (de Hoffmann & Stroobant, 2007).

#### 1.3.4.5 Procesador

Registra los resultados. El espectro de masas resultante es un gráfico de la abundancia de cada ion *vs.* su relación  $m/z$ .

### 1.3.5 Preparación de la muestra para MS

La facilidad con la que pueden introducirse contaminantes en la muestra, así como la de que parte del contenido proteico pueda malograrse durante su manipulación, subraya la importancia de la primera etapa de todo experimento proteómico. Así pues, la muestra debe ser manejada con el máximo cuidado, prestando especial atención a evitar cualquier contaminación. La habitual presencia de queratina humana, proteína contaminante que con mayor frecuencia se encuentra en los análisis proteómicos, enfatiza la importancia de un manejo cuidadoso de la muestra durante su preparación. Además, muchos de los agentes químicos utilizados en biología celular deben ser cuidadosamente eliminados de la muestra antes de su análisis por MS, dado que la presencia de los mismos también influye negativamente en los resultados finales obtenidos (de Hoffmann & Stroobant, 2007).



El último paso en la preparación de la muestra es la digestión de las proteínas hasta sus péptidos resultantes. La tripsina es la enzima más comúnmente utilizada para llevar a cabo la digestión proteolítica dada su alta especificidad para escindir enlaces peptídicos entre residuos de lisina o arginina y cualquier siguiente aminoácido (Olsen *et al.*, 2004). Tras la digestión triptica, los péptidos resultantes tienen carga positiva, lo cual favorece su ionización en el posterior análisis de MS. Además, la tripsina es rentable por bajo coste y alta eficiencia (de Hoffmann & Stroobant, 2007).

### 1.3.6 Identificación de proteínas

La identificación de proteínas a partir de la huella peptídica (PMF, *Peptide Mass Fingerprinting*), obtenida por MS o a partir de los espectros de fragmentación y secuenciación de péptidos mediante MS/MS, son las aproximaciones basadas en la espectrometría de masas más utilizadas para la identificación de proteínas en los estudios proteómicos.

#### 1.3.6.1 Huella peptídica (PMF)

La identificación de las proteínas por huella peptídica (PMF) es una técnica analítica para la identificación proteica donde las proteínas se digieren usando una enzima proteolítica que corta específicamente en un punto concreto, de esta manera se obtiene un mapa de masas peptídicas único para cada proteína denominado "huella peptídica". Las masas de los péptidos resultantes se determinan por espectrometría de masas (Hernandez *et al.*, 2006; Standing, 2003).

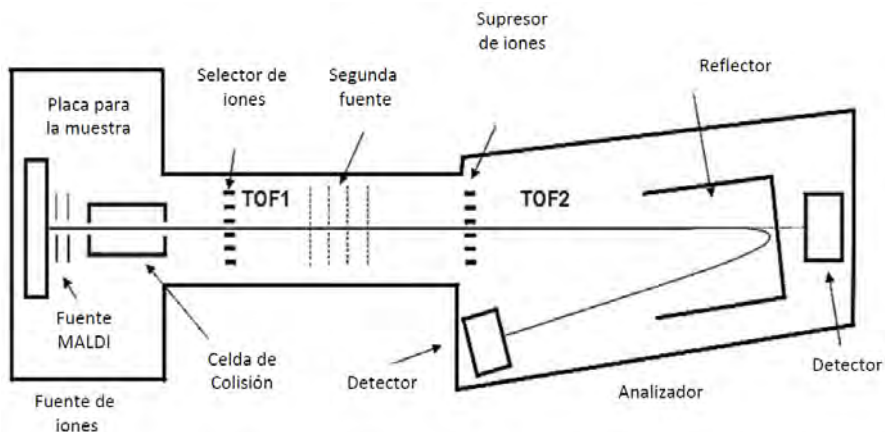
#### 1.3.6.2 Espectrometría de masas en tándem

Una configuración especial de la espectrometría de masas es la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Esta consiste en acoplar dos analizadores sucesivos separados por una cámara de fragmentación. En el primer analizador se selecciona un ion precursor de acuerdo a su masa (generalmente el más abundante) y ese ion es



luego fragmentado en la cámara de fragmentación por distintas metodologías. Los  $m/z$  son analizados en el segundo analizador. Uno de los equipamientos más comúnmente utilizados para este tipo de análisis y que fue utilizado en nuestros estudios de proteómica de expresión es el MALDI-TOF/TOF, donde el segundo analizador TOF analiza los iones resultantes tras la fragmentación del péptido. La fragmentación más común ocurre en las uniones peptídicas, resultando en fragmentos de longitud decreciente (por pérdida sucesiva de un aminoácido) que conservan el extremo amino- o el carboxilo terminal del péptido, denominados **b** o **y** respectivamente. Analizando los tamaños de los iones resultantes, es posible determinar la secuencia de aminoácidos de un péptido (secuenciación *de novo*), ya que al solapar la serie de iones **y** con los de la serie **b** se obtiene información redundante que es altamente específica de un péptido individual (Steen & Mann, 2004).

En la Figura 18 se esquematiza un diagrama de un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF. En general, estos aparatos se caracterizan por un arreglo colineal de dos analizadores de masas tipo TOF, en el TOF 1 los iones analito son separados, después una cámara de fragmentación selecciona y fragmenta los iones precursores elegidos para fragmentar. Los fragmentos pasan al TOF 2 donde son también acelerados y analizados. Mediante la aplicación de esta metodología de identificación de proteínas se logra identificar más del 80% de las marcas proteicas diferenciales seleccionadas de un gel 2D; esto se debe a la mayor información obtenida cuando se acoplan los espectros de huella peptídica más los de fragmentación de iones.



**Figura 18.** Diagrama esquemático de un espectrómetro de masas MALDI TOF/TOF. (Adaptado de Suckau *et al.* 2003).

La secuenciación por MS/MS puede llevarse a cabo tanto por secuenciación *de novo*, como por comparación con la información presente en las bases de datos (PFF, *Peptide Fragment Fingerprinting*).

#### 1.3.6.2.1 Identificación mediante huella de fragmentos peptídicos (PFF)

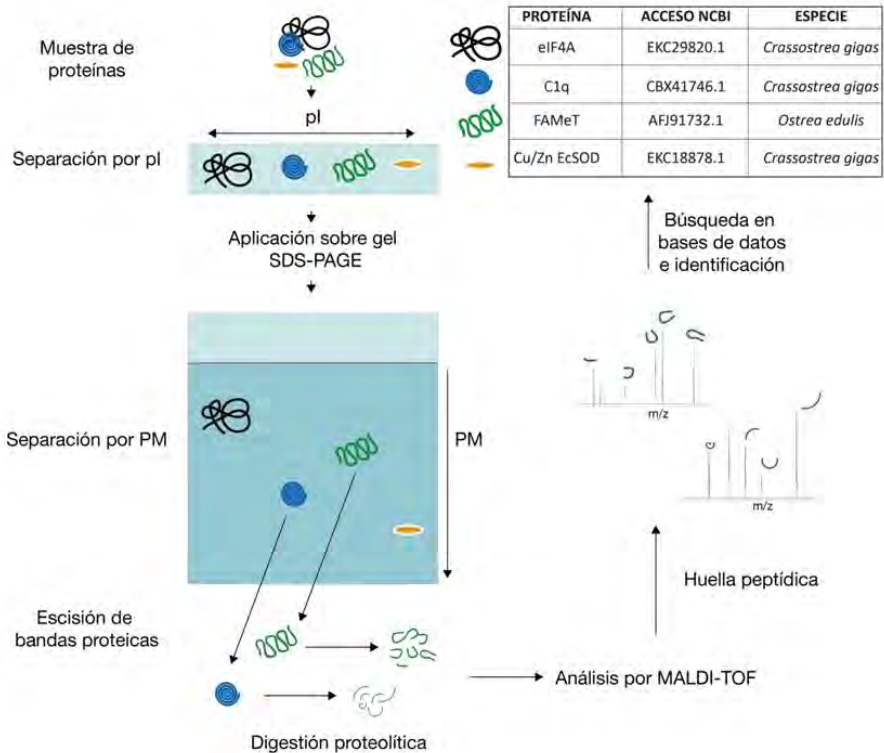
La identificación de las proteínas por huella de fragmentos peptídicos (PFF) es un método utilizado normalmente para la identificación de proteínas presentes en mezclas complejas, cuando hay disponibilidad de acceso a la información genómica del organismo estudiado. En los análisis de MS/MS automatizados, el espectrómetro de masas selecciona los picos del primer espectro MS obtenido (iones precursores o parentales), para su fragmentación y posterior análisis de los espectros de fragmentación resultantes (o espectros de MS/MS). Estos análisis generan cientos de espectros por hora, lo que requiere del uso de eficientes programas con los que llevar a cabo el análisis de los datos.

### 1.3.6.2.2 *Secuenciación de novo*

Si la secuencia del genoma de un organismo es aún desconocido o la identificación a través de PMF, o PFF no funciona, se requiere la caracterización completa de la estructura primaria de la proteína o la secuenciación *de novo* (Aebersold & Mann, 2003; Mann *et al.*, 2001). La secuenciación *de novo* requiere espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con el fin de determinar el orden de las secuencias de aminoácidos en un péptido. Los valores de  $m/z$  para los iones de los espectros de fragmentación resultantes (o espectros de MS/MS) se miden en un segundo espectrómetro de masas. La ventaja del enfoque de secuenciación *de novo* sobre el método de búsqueda de bases de datos es que permite la identificación de péptidos cuya secuencia exacta no está presente en la base de datos (Liska & Shevchenko, 2003).

### 1.3.7 Electroforesis bidimensional y espectrometría de masas

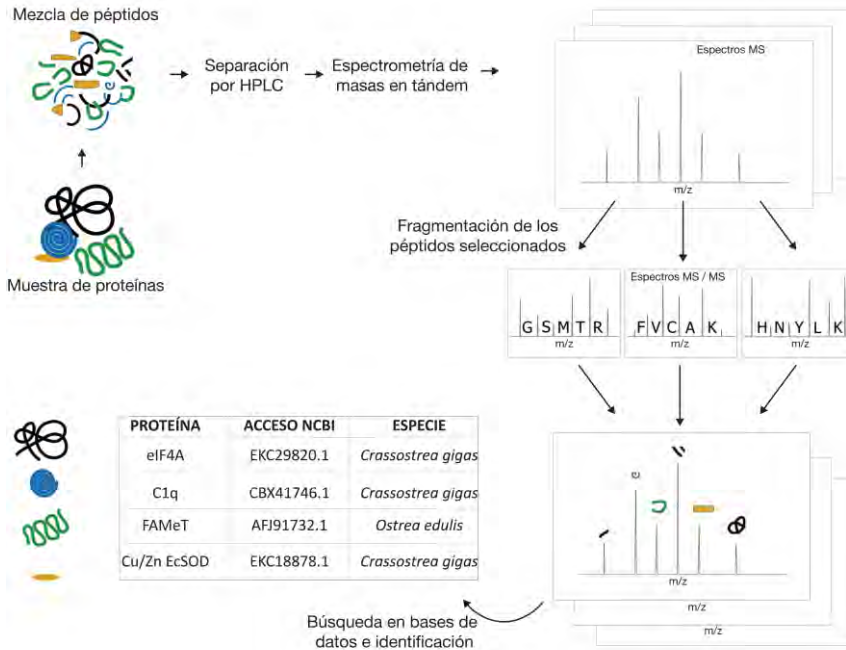
Las proteínas separadas en un gel bidimensional suelen identificarse a partir de su huella peptídica obtenida por MALDI-TOF. En este proceso, la banda de gel que contiene una única proteína aislada se digiere enzimáticamente con tripsina u otra proteasa para obtener una mezcla de péptidos que es detectada por el espectrómetro de masas. Este nos ofrece un espectro de masas que caracteriza a esa proteína y en el que los *ratios*  $m/z$  obtenidos para cada péptido son utilizados para realizar una búsqueda en las bases de datos y obtener su identificación (Figura 19). Si con el espectro de masas obtenido o huella peptídica, no es suficiente para obtener una identificación con confianza, puede ser usado un espectrómetro de masas en tándem (MALDI-TOF/TOF), puesto que este instrumento ofrece de manera directa la secuencia de uno o varios de los péptidos que identifican de manera inequívoca a la proteína (Thiede *et al.*, 2005).



**Figura 19.** Secuencia de pasos en un experimento típico de proteómica basada en 2DE. Una muestra compleja de proteínas se aplica a un gel con un gradiente de pH inmovilizado en el que las proteínas se separan de acuerdo a sus puntos isoeléctricos (pI). Una vez resueltas, el gel se deposita sobre un gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) en el que las proteínas se separan por peso molecular (PM) en una segunda dimensión perpendicular a la anterior. Tras la tinción del gel, las bandas proteicas de interés se extraen y se digieren; los péptidos resultantes permiten identificar la proteína correspondiente a partir de su huella peptídica por MALDI-TOF MS y subsiguiente búsqueda en bases de datos. (Imagen adaptada de Tambor *et al.* 2010).

### 1.3.8 *Shotgun* y espectrometría de masas

La combinación de la cromatografía líquida (LC, *liquid chromatography*) y la MS/MS es una aproximación multidimensional que permite la identificación de las proteínas que componen un proteoma de una manera más profunda y con un mayor rango dinámico y precisión en las cuantificaciones realizadas que cuando se utilizan técnicas de perfiles unidimensionales que registran todos los iones en un solo espectro de masas. Típicamente, en este tipo de aproximaciones una mezcla compleja de proteínas se digiere con tripsina u otra proteasa y la mezcla de péptidos obtenida se fracciona mediante HPLC (Cromatografía líquida de alta eficacia) antes de ser analizada en el espectrómetro de masas en tándem. Estos dos sistemas pueden estar conectados en línea de manera que los fluidos del capilar del HPLC fluyen directamente dentro de la fuente de ESI o, por el contrario, no estarlo, haciéndose uso de un colector de fracciones que va recuperando los fluidos de péptidos de una manera tiempo dependiente para ser sometidos manualmente al análisis de MS. El espectrómetro de masas en tándem adquiere primero un espectro de masas de la mezcla de péptidos, de la que ciertos candidatos se seleccionan para su fragmentación. En concreto, aquellos que presentan ciertos requerimientos en lo que a intensidad y carga se refiere se aíslan del resto para ser utilizados como precursores; después se fragmentan, obteniéndose un espectro de fragmentación (o espectro de MS/MS). La información procedente tanto del primer espectro MS como del de fragmentación o MS/MS puede ser usada para identificar a las proteínas presentes en la mezcla (Nesvizhskii, 2007). La Figura 20 esquematiza la secuencia de pasos seguida en un experimento típico de LC-MS/MS.



**Figura 20.** Secuencia de pasos seguida en un experimento típico de LC-MS/MS. Una mezcla compleja de proteínas se digiere enzimáticamente hasta sus péptidos correspondientes. La mezcla de péptidos puede ser fraccionada mediante cromatografía de alta resolución (HPLC) y cada fracción puede ir siendo inyectada directamente (*on-line*) en un espectrómetro de masas en tándem a medida que van eluyendo los péptidos. Opcionalmente, cada fracción puede ser recogida por separado mediante un colector de fracciones y cada una ser inyectada manualmente (*off-line*) en el espectrómetro de masas. En primer lugar, se adquieren espectros de MS desde los que ciertos péptidos son seleccionados para ser fragmentados. Los espectros de fragmentación resultantes (o espectros de MS/MS) se usan para llevar a cabo la identificación de la secuencia peptídica. La lista de péptidos secuenciados se utiliza con el fin de identificar, mediante su búsqueda en bases de datos, los componentes proteicos individuales de la muestra original. (Imagen adaptada de Tambor *et al.* 2010).

### 1.3.9 Búsqueda en bases de datos

Las búsqueda en base de datos es un elemento esencial en proteómica. Existen diferentes bases de datos, entre ellas las más comúnmente utilizadas son: la base de datos de proteínas del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), la base de datos NCBI Referencia de Secuencia (RefSeq), que proporciona un conjunto no redundante de secuencias que representan datos genómicos, transcripciones y proteínas (Pruitt *et al.*, 2005), y la fuente universal de proteínas (UniProt) (formada por Swiss-Prot, base de datos anotada manualmente y posteriormente revisada y el suplemento TrEMBL, anotada automáticamente y no revisada) (Nesvizhskii, 2007).

La herramienta central para la comparación de secuencias en biología molecular es el alineamiento de secuencias; se trata de una manera de disponer las secuencias primarias de ADN, ARN o proteínas para identificar regiones de similitud que puede ser una consecuencia de relaciones funcionales, estructurales o evolutivas (Lesk, 2002). En la mayoría de los casos se requiere la alineación de secuencias largas, muy variables y/o extremadamente numerosas que no pueden ser alineados manualmente. De manera que se aplica el uso de algoritmos para conseguir una alta calidad en el alineamiento de secuencias. Una gran cantidad de algoritmos computacionales, tales como la herramienta básica de búsqueda de alineamiento local "*Basic Local Alignment Search Tool*" (BLAST) y el alineamiento rápida "*Fast Alignment*" (FASTA) se han aplicado al alineamiento de secuencias problema, incluyendo métodos lentos pero optimizados como la programación dinámica o métodos probabilísticos diseñados para las búsquedas en bases de datos a gran escala. Debido a la alta velocidad, sensibilidad y disponibilidad actual, BLAST es el programa informático más utilizado para las búsquedas en bases de datos; por el contrario, FASTA tiene menores cualidades (Henikoff & Henikoff, 1992), pero es más adecuado para búsquedas de secuencias de ácidos nucleicos (Oladele *et al.*, 2009).



Los análisis proteómicos a gran escala se han visto beneficiados por el desarrollo de múltiples paquetes informáticos que permiten el análisis de los datos presentes en los espectros de MS/MS. Algunos de estos son Sequest (Eng *et al.*, 1994), Mascot (Perkins *et al.*, 1999), ProBID (Zhang *et al.*, 2002), Phenyx (Colinge *et al.*, 2003), X!Tandem (Craig & Beavis, 2004), GutenTag (Tabb *et al.*, 2003b), NoDupe (Tabb *et al.*, 2003a) y Sonar MS/MS (Field *et al.*, 2002). Muchas de estas herramientas (como Mascot y Sequest, por ejemplo), se basan en el ión precursor, utilizando la masa de este ión como principal criterio de búsqueda (Clauser *et al.*, 1999), aunque teniendo en consideración tanto el espectro de MS como el de MS/MS.

Los programas informáticos comparan el valor  $m/z$  de cada péptido del espectro MS experimental con los valores teóricos derivados de bases de datos como la del UniProt o la del NCBI. Los valores  $m/z$  teóricos se obtienen a partir de la traducción *in silico* de las secuencias de DNA de los genes presentes en las bases de datos hasta sus proteínas correspondientes, para las que las masas peptídicas de una proteólisis también teórica, son computadas. Si no hay posibilidad de acceder al genoma del organismo estudiado, las proteínas pueden ser identificadas por secuenciación *de novo* (Hernandez *et al.*, 2006; Standing, 2003).

En caso de concordancia entre los valores experimentales y teóricos, una proteína es asignada al espectro de masas experimental con cierta probabilidad de acuerdo al algoritmo utilizado. Esta puntuación, valor probabilístico o *score* estadístico indica lo bien correlacionados que se encuentran entre sí los valores experimentales y teóricos. A la hora de asignar un *score* se tienen en cuenta diferentes factores que influyen en la identificación de proteínas. Estos factores son, entre otros, la precisión con la que se corresponden los picos peptídicos comparados; la intensidad de estos picos; los picos peptídicos que, teóricamente pertenecientes a la proteína, no estén presentes en el espectro experimental; aminoácidos modificados; la aparición de errores o puntos de corte obviados o no específicos durante la digestión proteica; mutaciones no anotadas y variantes posttraduccionales de las proteínas, precisión en la masa del péptido

precursor; errores presentes en las secuencias peptídicas descritas en las bases de datos; la calibración del instrumento y picos originados a partir de otros péptidos o moléculas contaminantes que constituyen el ruido de fondo (Hernandez *et al.*, 2006; Palagi *et al.*, 2006). Las capacidades de algunos de estos paquetes informáticos, así como de los algoritmos implementados, se han comparado, observándose que los distintos programas producen identificaciones proteicas solapadas, especialmente para las proteínas de alta abundancia, pero también identificaciones únicas de proteínas para cada uno de los paquetes informáticos de manera independiente, lo que pone de manifiesto la complementariedad en sus métodos de análisis (Chamrad *et al.*, 2004; Kapp *et al.*, 2005; Moulder *et al.*, 2005).

Los tipos principales de bases de datos de secuencias adecuados para la búsqueda de datos de espectrometría de masas son: base de datos de proteínas no redundantes (nrdb), contienen el conjunto conocido de secuencias de proteínas de gran longitud, extraído de los principales repositorios de secuencia y purgado de duplicados. El nrdb mantenido en el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) permite consultar más de un centenar de bases de datos diferentes y tienen varias herramientas de análisis de información biológica como BLAST y FASTA. Las bases de datos de proteínas más populares son SwissProt y Uniprot junto con TrEMBL; accesibles en la página web del Instituto Europeo de Bioinformática ([www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/)) o en Uniprot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). El servidor principal de SwissProt y TrEMBL es Expasy ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)), especializado en proteínas y ofrece un gran número de herramientas para el análisis de la secuencia, estructura y función. La base de datos de etiquetas de secuencias expresadas (ESTs), tales como dbEST en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), contienen millones de secuencias de un solo pase corto de la secuenciación aleatoria de bibliotecas de ADNc. Estos se pueden buscar con el software adecuado, por lo general mediante la traducción en los marcos de lectura abiertos. Las bases de datos del genoma también se pueden buscar con MS datos. Las ventajas de buscar bases de datos de genomas completamente secuenciados son que cada péptido debe estar presente, por definición, y que a menudo los datos de MS puede

ayudar a definir la estructura del gen, tales como la estructura de arranque y parada y de intrón-exón (Mann *et al.*, 2001).

### **1.3.10 Aplicaciones de estudios proteómicas en moluscos**

El desarrollo de técnicas para el estudio de sistemas biológicos, incluyendo la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, ha ofrecido un gran potencial en desentrañar problemas biológicos y se ha empleado con éxito en múltiples áreas como estudios medioambientales, descubrimiento de fármacos e inmunología (Fu *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2010). Entre estos enfoques, la proteómica puede presentar todas las proteínas codificadas por el genoma de un organismo (Anderson & Anderson, 1998). Los cambios en el fenotipo celular solo pueden ser apreciados completamente cuando los transcriptomas se traducen a proteínas (Feder & Walser, 2005). El campo de la proteómica ha avanzado en gran medida debido al desarrollo de métodos de bajo coste y alto rendimiento para la separación e identificación de proteínas, tales como electroforesis de dos dimensiones (2-DE) y cromatografía líquida multidimensional combinada con espectrometría de masas (LC-MS) (Dowd, 2012; Gómez-Chiarri *et al.*, 2015). La proteómica basada en electroforesis bidimensional (2-DE) sigue siendo ampliamente útil para caracterizar complejas redes de proteínas biológicamente funcionales (Kingtong *et al.*, 2013), ya que no sólo puede describir el proteoma de un orgánulo, célula o tejidos sino que además puede comparar proteomas y así detectar diferencias proteómicas causadas por factores de estrés bióticos o abióticos (Lemos *et al.*, 2010). Sin embargo las técnicas basadas en la producción de geles presentan algunas limitaciones en la cobertura del proteoma completo, por lo que técnicas libres de geles como LC-MS se consideran una buena alternativa (Lambert *et al.*, 2005). Por otro lado, la aplicación a gran escala de estudios proteómicos en bivalvos permanece obstaculizada por la relativa escasez de datos genómicos en bases de datos públicos, necesarios para la identificación automatizada de proteínas (Campos *et al.*, 2012; Suárez-Ulloa *et al.*, 2013; Tomanek, 2011).

El análisis proteómico podría proporcionar una "instantánea" integrada de las proteínas funcionales en un momento concreto bajo una condición biológica determinada. Por tanto, una de las aplicaciones más utilizada es el estudio de proteómica de expresión, estudio de la expresión de proteínas entre muestras que difieren en alguna variable, dentro de las cuales destacan variaciones en procesos biológicos, sometidas a contaminación, a estrés, cambios en el medioambiente, en distintas etapas del desarrollo o bajo la infección por diferentes patógenos (Amelina *et al.*, 2007; G. Chen *et al.*, 2011).

Un pequeño número de estudios en bivalvos están dedicados a la caracterización de funciones específicas, tales como la formación de la concha (Marie *et al.*, 2012, 2011; G. Zhang *et al.*, 2012), la reproducción y el desarrollo (Corporeau *et al.*, 2012; Huan *et al.*, 2012; Diz *et al.*, 2012b, 2013; Kingtong *et al.*, 2013), la especiación (Martínez-Fernández *et al.*, 2008) y la búsqueda de biomarcadores tumorales (Alvarez-Chaver *et al.*, 2011).

El biomonitorio del medio acuático y la evaluación de la salud del ecosistema juegan un papel esencial en el desarrollo de estrategias efectivas para la protección del medio ambiente, la salud y el desarrollo sostenible. El creciente interés en la aplicación de tecnologías proteómicas para solventar problemas toxicológicos y su relevancia en la búsqueda de proteínas implicadas en respuestas toxicológicas como biomarcadores hacen de la proteómica una herramienta altamente generalizada (Campos *et al.*, 2012; Lemos *et al.*, 2010; Monsinjon & Knigge, 2007). Se han encontrado variaciones importantes en la expresión proteica de distintos bivalvos como consecuencia de la exposición a diferentes contaminantes, entre ellos metales pesados como el Cobre, el Mercurio o el Cadmio, es el caso de mejillones (Apraiz *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2014; Leung *et al.*, 2011; Riva *et al.*, 2011; Shepard & Bradley, 2000), almejas (Chora *et al.*, 2009; Dowling *et al.*, 2006; H. Wu *et al.*, 2013b) y ostras (Luo *et al.*, 2014; Muralidharan *et al.*, 2012; Q. H. Zhang *et al.*, 2013).

Los efectos de moléculas tóxicas producidas por dinoflagelados y otras microalgas en invertebrados marinos pueden ser evaluados por

enfoques proteómicos. Durante estaciones de afloramiento de algas nocivas muchos invertebrados filtradores pueden acumular ficotoxinas en niveles extremadamente altos que representan una grave amenaza para la salud humana. El análisis proteómico se puede utilizar para la detección e identificación de biomarcadores de contaminación por biotoxinas y componentes que participan en la respuesta de los tejidos a la contaminación exógena (Manfrin *et al.*, 2012; Ronzitti *et al.*, 2008).

Además, la investigación del proteoma se está utilizando actualmente para estudiar la expresión diferencial de proteínas de bivalvos bajo diferentes tipos de estrés (tanto biótico como abiótico), en respuesta a diferentes condiciones ambientales (Fuentes *et al.*, 2002; López *et al.*, 2001, 2005; Mosquera *et al.*, 2003; Mi *et al.*, 2007; Campalans & Lohrmann, 2009; Tomanek, 2011, 2014; Fields *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015; Campos *et al.*, 2016), entre ellos el estudio de los posibles cambios proteómicos ocurridos en invertebrados marinos en respuesta a la acidificación de los océanos como consecuencia de la actividad antropogénica (Timmins-Schiffman *et al.*, 2014; Tomanek *et al.*, 2011; Tomanek & Zuzow, 2010).

Una de las aplicaciones más utilizadas en los estudios proteómicos de moluscos se centra en las interacciones patológicas, para ello es necesario el conocimiento del sistema inmune (Guo *et al.*, 2015; Peng, 2013; Z. Sun *et al.*, 2014a). La proteómica se ha utilizado para detectar proteínas expresadas bajo la infección por diferentes patógenos (G. Chen *et al.*, 2011; Huan *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2013; Y. Wang *et al.*, 2012), en la interacción hospedador-parásito (Biron *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2008; Simonian *et al.*, 2009; Castellanos-Martínez *et al.*, 2014; Fernández-Boo *et al.*, 2016), y para llegar a encontrar marcadores de resistencia/susceptibilidad frente a la enfermedad (Vergote *et al.*, 2005; Bouchut *et al.*, 2006b; Cao *et al.*, 2009; Simonian *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2015).

### 1.3.11 Genómica funcional y proteómica

Para entender todos los pasos en la decodificación del mensaje del ADN es necesario un estudio de la expresión génica y su regulación, así como un análisis del transcriptoma (Ozsolak & Milos, 2011; Stapley *et al.*, 2010) y del proteoma (Diz *et al.*, 2012a). La proteómica complementa los enfoques de la genómica funcional (Gerlai, 2002; Hannon, 2002; Kuruvilla *et al.*, 2002; Shoemaker & Linsley, 2002). Lo ideal sería que las anotaciones del genoma pudieran ser completamente impulsadas por la proteómica; de hecho, los datos proteómicos a gran escala fueron reconocidos como una fuente potencialmente rica para la validación y reevaluación de las anotaciones del genoma (Mann & Pandey, 2001).

Para comprender mejor los procesos ocurridos en las enfermedades de bivalvos es necesario un gran esfuerzo centrado en la caracterización del efecto de diferentes patologías en los cambios de la expresión proteica del animal utilizando nuevos enfoques proteómicos (es decir *shotgun* y/o cromatografía líquida unido a espectrometría de masas en tándem, LC-MS/MS), lo que se facilitará ahora que algunas bases de datos transcriptómicas y secuencias de genomas están disponibles (Gómez-Chiarri *et al.*, 2015).

## 2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La ostra plana europea es un recurso de gran importancia a nivel ecológico, se considera una especie clave que proporciona importantes servicios al ecosistema por tratarse de animales filtradores y formadores de arrecifes (Guo *et al.*, 2015). Por otro lado las propiedades organolépticas de la ostra plana la convierten en un producto irremplazable para la nutrición humana, por lo que el sector de la ostricultura aporta gran cantidad de beneficios económicos. El protozoo parásito *Bonamia ostreae* ha causado mortalidades masivas en los cultivos de *Ostrea edulis*, disminuyendo tremendamente la producción del sector; la especie co-genérica *B. exitiosa* detectada más recientemente en Europa, podría estar contribuyendo en el declive de la ostra plana europea. Todo ello unido a la sobreexplotación del recurso ha llevado a que los bancos de ostras *O. edulis* sean uno de los hábitats marinos más amenazados de Europa (Airoldi & Beck, 2007). Aumentar los bivalvos filtradores nativos, a través de la conservación tiene potencial para restablecer todas las funciones servidas por los hábitats biogénicos que crean, mejorar la calidad del agua y controlar los sistemas donde las poblaciones naturales se han agotado (Jackson *et al.*, 2001).

Una de las medidas tomadas para recuperar las poblaciones de la ostra plana europea es la selección de variedades menos susceptibles o tolerantes a *B. ostreae*. Se han realizado intentos en Francia, Irlanda y España con resultados satisfactorios en términos de mortalidad y



prevalencia de la enfermedad (Villalba & Figueras, 2011; Lynch *et al.*, 2014).

Sin embargo, las causas últimas que generan esta menor susceptibilidad a bonamiosis en estas variedades de ostras se desconocen y sería de gran ayuda descubrirlas ya que así podría realizarse una búsqueda más eficaz de una variedad tolerante o incluso resistente a bonamiosis. Además, la identificación de las claves de la susceptibilidad de *O. edulis* a *B. ostreae* podría tener un potencial efecto en otras enfermedades causadas por parásitos del género *Bonamia* spp. que afectan a otras especies de ostras distribuidas en diferentes zonas del mundo.

Existen muchos estudios sobre la interacción de *O. edulis* y *Bonamia* spp., sin embargo, todavía quedan muchas preguntas por resolver. Puesto que *B. ostreae* es un parásito intracelular, que se multiplica dentro de los hemocitos de la ostra y precisamente estas células están implicadas directamente en el sistema inmune del hospedador, diferencias en el sistema de defensa podrían ser la clave que explique las diferencias de susceptibilidad encontradas entre estirpes de *O. edulis*. Morfológicamente se pueden distinguir dos tipos celulares básicos dentro de los hemocitos de bivalvos, hialinocitos y granulocitos; sin embargo, las diferencias funcionales y habilidades específicas son poco conocidas: mientras que se cree que los granulocitos son más eficientes en defensa y en la eliminación de microorganismos (Wang *et al.*, 2017), los hialinocitos parecen estar más especializados en coagulación y cicatrización (Suzuki *et al.*, 1991).

Profundizar en las diferencias funcionales de cada tipo hemocitario y comprender mejor los mecanismos defensivos del bivalvo, podría ayudar a combatir las enfermedades de las ostras.

Para entender mejor la relación parásito-hospedador y las bases de la tolerancia a la bonamiosis es necesario profundizar en el estudio del sistema inmunitario de la ostra y de los mecanismos específicos implicados en su interacción y en la lucha contra el parásito. Mientras que se han identificado varios genes clave en la respuesta inmune de

*O. edulis* en respuesta al parásito a través de enfoques genómicos (Martín-Gómez *et al.*, 2012; Morga *et al.*, 2010, 2011a, 2011b, 2012; Pardo *et al.*, 2016), poco se sabe sobre las proteínas involucradas en dicho proceso. Las diferencias en la expresión proteica pueden ayudar a entender mejor los procesos biológicos ocurridos en esta interacción. De manera que ampliar el conocimiento en este campo podría dar las claves para conseguir una selección de individuos con mayor resistencia o tolerancia a la enfermedad desarrollando así estirpes de ostras menos susceptibles a bonamiosis, lo que supondría una mejora para la conservación de las poblaciones naturales de *Ostrea edulis*.

Por ello, el **objetivo general es el estudio del sistema de defensa de la ostra plana europea mediante un enfoque proteómico y relacionarlo con la resistencia o tolerancia a la bonamiosis**. Para ellos se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Comparar los patrones proteicos de la hemolinfa de *Ostrea edulis* infectadas por *Bonamia* spp. y ostras no infectadas.
2. Comparar los patrones proteicos de la hemolinfa de diferentes stocks de ostras *Ostrea edulis* con diferente susceptibilidad a bonamiosis.
3. Identificar proteínas clave en la interacción *Ostrea edulis* - *Bonamia* spp., que puedan ser reconocidas como biomarcadores de resistencia/tolerancia a la enfermedad.
4. Estudiar el proteoma completo de los distintos tipos hemocitarios de *Ostrea edulis*, mediante eletroforesis bidimensional y "shotgun", identificando proteínas exclusivas de cada tipo hemocitario, hialinocitos y granulocitos, que permitan determinar funciones diferentes de cada tipo celular en el marco general de la respuesta inmune.
5. Realizar un análisis proteómico de granulocitos e hialinocitos enfrentados a los inductores de respuesta inmunitaria LPS, Poly I:C y Zymosan, para determinar si hay diferencias en la respuesta entre los tipos hemocitarios.



### 3 COMPARACIÓN DEL PROTEOMA DE LA HEMOLINFA ENTRE OSTRAS (*Ostrea edulis*) AFECTADAS POR BONAMIOSIS Y OSTRAS NO AFECTADAS

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

##### 3.1.1 Bonamiosis

*Ostrea edulis* es altamente susceptible a la infección por los protozoos parásitos *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980) y *Bonamia exitiosa* (Hine *et al.*, 2001), agentes responsables de causar bonamiosis en Europa. Esta enfermedad causada por las especies del género *Bonamia* spp. (Tabla 1) en diferentes partes del mundo (Figura 1), tiene un efecto patógeno severo en su huésped y es la principal causa de muerte en las poblaciones de la ostra plana europea, llegando a provocar un 90% de mortalidad entre las ostras que parasita (Cranfield *et al.*, 2005; Doonan *et al.*, 1994; McArdle *et al.*, 1991).

Las infecciones por *B. ostreae* y *B. exitiosa* se incluyen dentro de las enfermedades de declaración obligatoria establecida por la Organización Mundial de la Salud Animal, por ser responsable de ocasionar mortandades importantes en los moluscos bivalvos que infecta (<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2018/>).

**Tabla 1.** Especies del género *Bonamia*, rangos de hospedador y de distribución geográfica y primera cita bibliográfica.

Género <i>Bonamia</i>			
Especie	Hospedador	Localización	Referencia
<i>B. ostreae</i>	<i>Ostrea edulis</i> <i>Ostrea chilensis</i>	Francia, España, Holanda, Irlanda, Reino Unido, Italia, Dinamarca, California y Maine (EE. UU.), Canadá, Marruecos, Nueva Zelanda	Pichot <i>et al.</i> 1980
<i>B. exitiosa</i>	<i>Ostrea chilensis</i> <i>Ostrea angasi</i> <i>Ostrea edulis</i> <i>Ostrea puelchana</i> <i>Ostrea stentina</i> <i>Saccostrea glomerata</i> <i>Crassostrea ariakensis</i> <i>Crassostrea virginica</i> **	Nueva Zelanda, Australia, España, Italia, Francia, Reino Unido, Argentina, Chile, Túnez, Portugal, Carolina del Norte y Florida (EE. UU.)	Hine <i>et al.</i> 2001
<i>B. roughleyi</i> *	<i>Saccostrea commercialis</i>	Nueva Gales del Sur (Australia)	Farley <i>et al.</i> 1988
<sup>o</sup> <i>B. perspora</i>	<i>Ostreola equestris</i>	Carolina del Norte (EEUU)	Carnegie <i>et al.</i> 2006

\* *Nomem dubium* (Carnegie *et al.*, 2014)

\*\* Casos positivos por PCR no confirmados por histología

La Unión Europea también incluyó a ambas especies en la Directiva 2006/88/EC relativa a “los requisitos zoonosarios de los animales y de los productos de la acuicultura y a la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos”, actualmente en vigor. Un aspecto importante en relación a la bonamiosis es que una vez que el parásito se ha introducido en un área determinada, no es posible erradicar la enfermedad (van Banning 1985; van Banning 1987), por tanto, los esfuerzos para prevenir y controlar la bonamiosis son realmente necesarios.

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*) afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

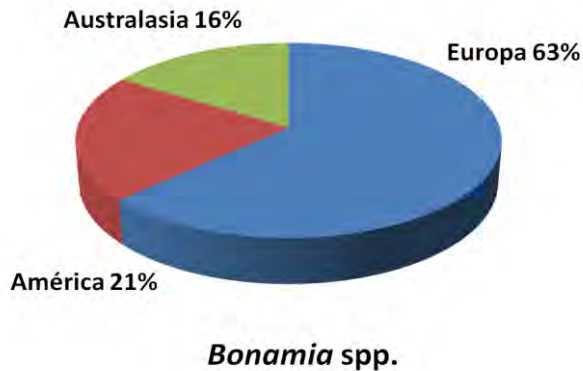


Figura 1. Abundancia de los protozoos parásitos del género *Bonamia* spp., en los distintos continentes. Imagen adaptada de Fernández Robledo *et al.* 2014.

### 3.1.2 Taxonomía

El género *Bonamia* pertenece al grupo Haplosporida dentro del Supergrupo Rizharia, primer rango Cercozoa, segundo rango Ascetosporea (Adl *et al.*, 2012). Dicho grupo contiene protozoos parásitos de invertebrados marinos y de agua dulce, entre los que se incluyen algunos de los patógenos más importantes de Moluscos (Burrenson & Ford, 2004; Arzul & Carnegie, 2015). Una característica de los Haplosporidios es la presencia de una fase de esporas unicelulares, típicamente uninucleadas, en su ciclo de vida (Burrenson & Ford, 2004). Dentro de su hospedador, estos protozoos existen como células uni o multinucleadas y contienen unos orgánulos citoplasmáticos particulares, también observados en otros protistas Ascetosporea, denominados haplosporosomas (Perkins, 1989). La existencia de esporas se ha observado en *Bonamia perspora* (Carnegie *et al.*, 2006); sin embargo, no hay registros de esporas en *B. ostrea* y *B. exitiosa*; a pesar de este hecho, ambas especies pertenecen al grupo taxonómico Haplosporidia (Carnegie & Cochenec-Laureau, 2004) por presentar haplosporosomas y en base a análisis moleculares (Carnegie *et al.*, 2000; Cochenec-Laureau *et al.*, 2003b). Las

especies de *Bonamia* spp. forman un clado monofilético dentro de los taxones del grupo Haplosporidia (Reece *et al.*, 2004; Arzul & Carnegie, 2015; Azevedo & Hine, 2017) (Figura 2).



Figura 2. Cladograma del Orden Haplosporidia mostrando la posición taxonómica de las distintas especies de *Bonamia* spp. (Imagen de Arzul & Carnegie, 2015).

### 3.1.3 *Bonamia ostreae*

*Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980) es un parásito intrahemocitario de la ostra plana europea *O. edulis* (Comps *et al.*, 1980). Este protozoo fue incluido por Farley *et al.* (1988) en el grupo de las “microcélulas”, término que había empleado J.G. Mackin para



referirse al agente causante de una enfermedad de la ostra del Pacífico en la Isla de Denman (Columbia Británica, Canadá), posteriormente identificado como *Mikrocytos mackini* (Farley *et al.* 1988), debido al reducido tamaño de este parásito. El parásito *B. ostreae*, por tanto, también se caracteriza por su pequeño tamaño (1-3  $\mu$ m de diámetro) y presenta un núcleo en posición periférica (Abollo *et al.*, 2008) (Figura 3). La forma más común en la que se puede observar es en estadios uni o binucleados que se pueden encontrar tanto dentro de los hemocitos del molusco, como en el interior de células del epitelio branquial (Montes *et al.*, 1994), o extracelularmente en los espacios tisulares. Esporádicamente se encuentran estadios plasmodiales en ostras moribundas o postmortem (Brehélin *et al.*, 1982).

### 3.1.3.1 Distribución geográfica de *Bonamia ostreae*

La infección de *O. edulis* por *B. ostreae* fue registrada por primera vez en la costa oeste (California) de EE.UU. (Katkansky *et al.*, 1969) aunque entonces no se identificó el agente etiológico. En Europa se detectó por primera vez en Francia en 1979 (Comps *et al.*,



**Figura 3.** Micrografía, obtenida con microscopio electrónico de transmisión, de un corte ultrafino que muestra una microcélula uninucleada de *Bonamia ostreae* en cuyo citoplasma aparecen múltiples haplosporosomas (marcados con flechas). N: núcleo m: mitocondria (Imagen obtenida de Abollo & Villalba 2012).

1980; Grizel & Tige, 1982) y estudiando la enfermedad en Francia se identificó y describió el parásito causante como la nueva especie *B. ostreae* (Pichot *et al.*, 1980). Con el tiempo se comprobó que el parásito detectado en California (Elston *et al.*, 1986; Friedman *et al.*, 1989) y posteriormente en la costa este de EE.UU. (en Maine) (Barber & Davis, 1994; Friedman & Perkins, 1994) mostraban una morfología similar a la de *B. ostreae*. Además, el uso de anticuerpos monoclonales no demostró diferencias antigénicas entre las células de *Bonamia* aisladas en Europa y en los EE.UU. (Mialhe *et al.*, 1988), estos resultados y los registros comerciales históricos condujeron a formular la hipótesis que responsabiliza la propagación del parásito, dentro de EE.UU. y a Europa, al transporte comercial de ostras planas infectadas con *B. ostreae* a zonas exentas de la enfermedad, considerando que el foco inicial de la propagación se encontraba en California (Cigarria & Elston, 1997; Elston *et al.*, 1986). En la actualidad tanto la Legislación de la Unión Europea en materia de Sanidad Animal, como la Organización Mundial de Sanidad Animal, incluyen medidas para impedir la introducción del parásito en zonas no afectadas. (<https://www.ecolex.org/es/details/legislation/ley-no-82003-ley-de-sanidad-animal-lex-faoc054176/>) ([http://www.oie.int/index.php?id=171&L=2&htmlfile=titre\\_1.11.htm](http://www.oie.int/index.php?id=171&L=2&htmlfile=titre_1.11.htm))

En el continente Europeo, tras su aparición en Francia, *B. ostreae* se propagó rápidamente, detectándose en España en 1980 (Figueras, 1991; Montes & Melendez, 1987; Polanco *et al.*, 1984), Holanda en 1980 (van Banning 1985), Inglaterra en 1982 (Bannister & Key, 1982), e Irlanda en 1987 (McArdle *et al.*, 1991). En los últimos años *B. ostreae* también se ha encontrado en Canadá en 2004 (Marty *et al.*, 2006), en Marruecos en 2005 (OIE 2005), en Escocia en 2006 (Bruno *et al.*, 2007), en Italia en 2009 (Narcisi *et al.*, 2010), y por último en Dinamarca en 2015 (Madsen *et al.*, 2015). Recientemente, *B. ostreae* se ha detectado en Nueva Zelanda como causante de mortandades masivas de la ostra plana nativa de la zona, *Ostrea chilensis* (Lane *et al.*, 2016, 2018) (Figura 4).

### 3.1.3.2 Rango de hospedador de *Bonamia ostreae*

Además de su hospedador tipo *Ostrea edulis*, Carnegie & Cochenec-Laureau (2004) demostraron que, al menos experimentalmente, existen más especies de ostra susceptibles a la infección por *Bonamia ostreae* como son: *Ostrea angasi*, *Ostrea chilensis*, (= *Tiostrea chilensis*, =*T. lutaria*, =*Ostrea lutaria*), *Ostrea puelchana*, *Ostrea denselamellosa*, *Crassostrea ariakensis* (= *C. rivularis*) y *Crassostrea angulata*.

Otros trabajos sugieren que la ostra japonesa *Crassostrea gigas*, las almejas *Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum*, los mejillones *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis* y el berberecho *Cerastoderma edule* no son susceptibles a este parásito (van Banning 1987; Figueras & Robledo 1994; Renault *et al.* 1995; Culloty *et al.* 1999), ya que dichos bivalvos no pudieron ser infectados en experimentos realizados en el campo y en el laboratorio, empleando tanto infecciones naturales como experimentales. Todos los estudios se realizaron empleando como técnicas diagnósticas la citología y la histología, ya que las técnicas de diagnóstico molecular basadas en reconocimiento de ADN no se habían desarrollado. Sin embargo Lynch *et al.* 2010, empleando técnicas de PCR e hibridación *in situ*, detectaron células de *B. ostreae* en el interior de hemocitos de *Crassostrea gigas*, lo que sugiere la idea de que la ostra del Pacífico pudo (y puede) contribuir a la expansión del parásito.

### 3.1.4 *Bonamia exitiosa*

*Bonamia exitiosa* (Hine *et al.*, 2001), es también un parásito intrahemocitario, pero en este caso el tamaño de la microcélula es algo mayor, presenta un diámetro de 2 a 5  $\mu$ m y un núcleo en posición central o subcentral (Abollo *et al.*, 2008). Al igual que *B. ostreae*, *B. exitiosa* normalmente se puede observar en estadios uni o binucleados, tanto dentro de los hemocitos como extracelularmente; en alguna ocasión se han detectado plasmodios con 4 núcleos (Hine, 1992).

### 3.1.4.1 Distribución geográfica y rango de hospedador de *B. exitiosa*

Este protozoo es originario del Hemisferio Sur donde es responsable de provocar mortandades masivas en ostras *O. chilensis* de Nueva Zelanda (Doonan *et al.*, 1994; Hine *et al.*, 2001). *B. exitiosa* también se ha detectado en Australia en ostras *Ostrea angasi* (Corbeil *et al.*, 2006) y *Saccostrea glomerata* (Carnegie *et al.*, 2014). Parásitos del género *Bonamia* se han descrito en varias especies de ostras, *O. chilensis* en Chile (Kern, 1993), *O. puelchana* en Argentina (Kroeck & Montes, 2005) y *Crassostrea ariakensis* en Carolina del Norte (Burreson *et al.*, 2004); en la actualidad el laboratorio de referencia de la OIE para la bonamiosis ha incluido todos estos registros de *Bonamia* spp. de localidades tan dispares en la misma especie, *B. exitiosa* (López-Flores *et al.*, 2007).

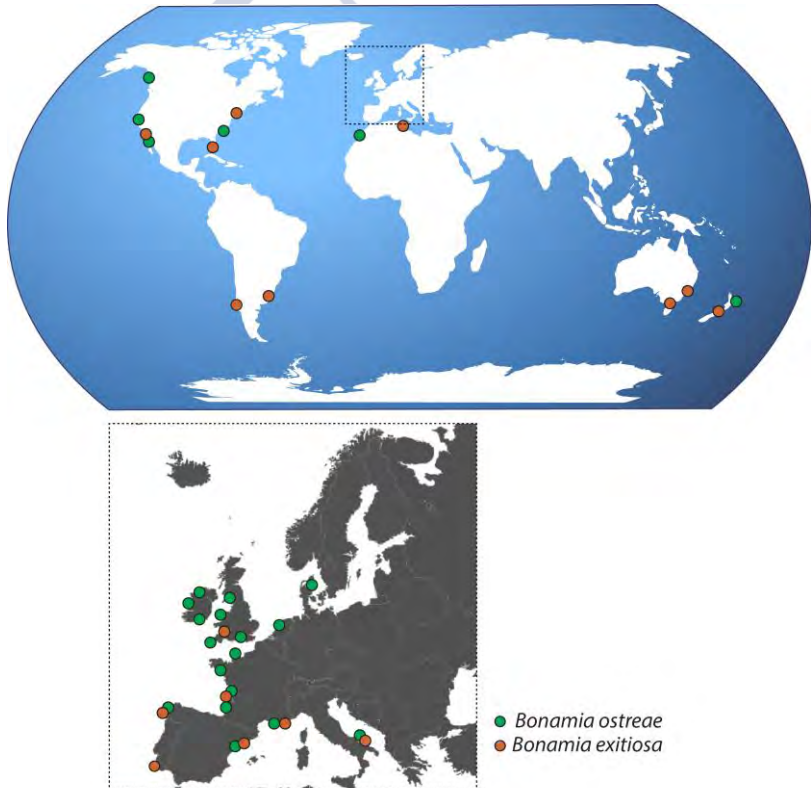
*Ostrea stentina* de Nueva Zelanda y de Túnez fueron infectadas con un tipo *Bonamia* spp. estrechamente relacionada con *Bonamia exitiosa* y *B. roughleyi* basado en las secuencias genéticas de ADNr de la subunidad pequeña (SSU) y del espacio interno transcrito (ITS) (Hill *et al.*, 2010). Parásitos identificados previamente como *Bonamia roughleyi* en Australia parecen ser en realidad *B. exitiosa* (Carnegie *et al.*, 2014). *Bonamia perspora* (similar a *B. exitiosa*) se detectó en *Ostreola equestris* (= *Ostrea stentina*) de Carolina del Norte (Carnegie *et al.*, 2006). Mediante PCR se han detectado positivos para *B. exitiosa* en ostras *Crassostrea ariakensis* & *C. virginica* de Florida, confirmándose la infección mediante histología sólo en ostras *C. ariakensis* (Dungan *et al.*, 2012). Estudios filogenéticos confirman que las secuencias de *Bonamia* spp. encontradas en *Crassostrea ariakensis* en Florida y Carolina del Norte, *O. stentina* en Carolina del Norte y del Sur, Argentina, Túnez y Nueva Zelanda, *O. puelchana* en Argentina, *O. lurida* en California, *O. angasi* y *Saccostrea glomerata* en Australia, y *O. chilensis* en Nueva Zelanda pertenecen a *B. exitiosa* (Hill *et al.*, 2014).

En las costas europeas *B. exitiosa* se ha descubierto afectando a *O. edulis*; primero en la costa oeste de España (Océano Atlántico)

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*)  
afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

(Abollo *et al.*, 2008), y más tarde en Francia en 2008 (Arzul *et al.*, 2010), en Italia (Mar Adriático) en 2008 (Narcisi *et al.*, 2010), en la costa este de España (Mar Mediterráneo) en 2011 (Carrasco *et al.*, 2012), en Inglaterra en 2011 (Longshaw *et al.*, 2013) y en el sur de Portugal (Batista *et al.*, 2016). Por lo que *Bonamia exitiosa* es una especie con amplia distribución geográfica y gran variedad de hospedadores (Figura 4).

Se ha detectado la presencia de ADN de *B. exitiosa* en la ostra del pacífico *Crassostrea gigas* mediante PCR, por lo que existe la posibilidad de que esta ostra rizada sea portadora del parásito (Lynch



**Figura 4.** Distribución mundial de los protozoos parásitos *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa*.



*et al.*, 2010).

### **3.1.5 Ciclo de vida y transmisión de *Bonamia* spp.**

Se sabe que las esporas no son imprescindibles en la propagación de bonamiosis (Reece *et al.*, 2004), puesto que se puede transmitir directamente de una ostra a otra por cohabitación (Culloty *et al.*, 1999; Elston *et al.*, 1986; Hine *et al.*, 2002), o por inoculación del parásito purificado (Mialhe *et al.*, 1988). Esto sugiere que presenta un ciclo de vida directo y permite entender la rápida propagación de la enfermedad. Sin embargo, existen otros factores que hacen pensar que el ciclo de vida del parásito debe incluir algún tipo de vector o de reservorio. La espora es un estadio característico del Grupo Haplosporidia al que pertenece *Bonamia* spp. (Burreson & Ford, 2004). Además, cuando una zona infectada por el parásito se limpia completamente de ostras y, al cabo de varios años, se reintroduce el cultivo en el área, la enfermedad vuelve a desarrollarse rápidamente, reafirmando la idea de la existencia de algún tipo de reservorio donde el protozoo sobrevive (van Banning 1988). Otros estudios enfocados a encontrar posibles hospedadores reservorios o vectores, demostraron la presencia de ADN de *B. ostreae* en 8 invertebrados bentónicos y 19 muestras de zooplancton, utilizando PCR como técnica diagnóstica (Lynch *et al.*, 2007). Al estudiar qué especies podrían actuar como reservorio del parásito y provocar una posible infección en *O. edulis*, estos autores observaron que ostras sanas adquirirían la infección cohabitando con ejemplares del equinodermo *Ophiothrix fragilis* recogidos en bancos de ostra afectados por el parásito. No está claro si el equinodermo estaba infectado por *B. ostreae* o simplemente transportaba células del parásito sin que éste le provocase infección. Posteriormente Lynch *et al.* (2010) detectaron mediante PCR ostras *C. gigas* infectadas por *B. ostreae* y *B. exitiosa*, tanto en individuos recogidos en la naturaleza como inoculados experimentalmente en el laboratorio; incluso llegaron a detectar microcélulas de *B. ostreae* en los tejidos de *C. gigas* mediante histología convencional y también con hibridación *in situ*. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que *C. gigas* actúe como reservorio o vector de ambas especies de

*Bonamia*, lo que pone de manifiesto la trascendencia que podrían suponer los movimientos de ostras rizadas *C. gigas* de áreas endémicas a áreas libres de la infección, tanto pasados como futuros, en la supervivencia y conservación de *O. edulis*. A pesar de todos los estudios realizados, el ciclo de vida completo de *Bonamia* spp. todavía no se conoce.

### 3.1.6 Interacción parásito - hospedador

La vía de entrada más probable de *Bonamia* en el bivalvo es mediante la filtración de agua de mar (Bucke, 1988; Montes *et al.*, 1994). Dentro del organismo, tras atravesar el epitelio branquial, el parásito es fagocitado por los hemocitos, quedando incluido dentro de un fagolisosoma, donde es capaz de multiplicarse por fisión binaria (Figs. 5 y 6). Todos los tipos hemocitarios son capaces de fagocitar a *Bonamia* spp. mediante un proceso de fagocitosis activa (Chagot *et al.*, 1992); además, *B. ostreae* parece participar activamente en su propia internalización (Chagot *et al.*, 1992). Se ha demostrado que una HSP90 de *B. ostreae* participa en la internalización del parásito en los hemocitos de *O. edulis* (Prado-Alvarez *et al.*, 2013). A pesar de fagocitar al parásito, los hemocitos de la ostra plana no son capaces de destruirlo (Montes *et al.*, 1994), *Bonamia* spp. parece tener algún mecanismo que bloquea la capacidad destructiva del metabolismo del hemocito, de manera que el parásito es capaz de sobrevivir y proliferar en su interior sin degradarse, llegando a provocar la ruptura del hemocito (Fig. 6).

Se han propuesto diversos mecanismos para explicar cómo los patógenos logran evadir el sistema defensivo de los organismos invertebrados que parasitan (Yoshino & Vasta, 1996). Existen mecanismos pasivos, por los cuales el parásito intenta no activar el sistema defensivo del hospedador, como son el parasitismo intracelular, el mimetismo y el enmascaramiento con moléculas del propio hospedador y mecanismos de evasión activos por los cuales el parásito sintetiza enzimas que inhiben o los protegen de la acción de las especies reactivas de oxígeno producidas por el hospedador, o causa la supresión o interferencia con otros procesos de respuesta

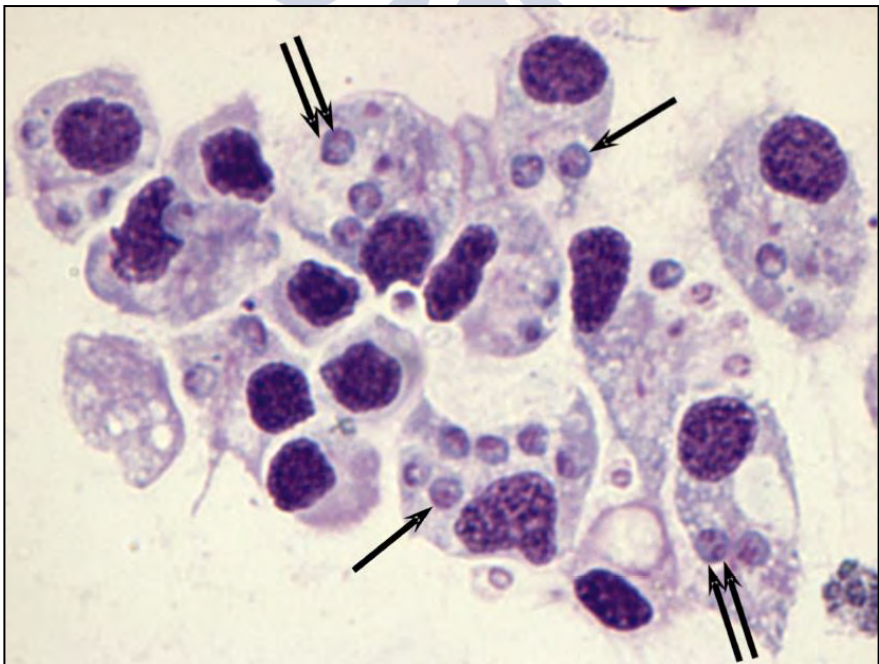


inmune. Algunas de las estrategias específicas de supervivencia de parásitos obligados de células de defensa en vertebrados son: evadir la activación de la fagocitosis (McLeod *et al.*, 1991), contrarrestar el estallido respiratorio con enzimas antioxidantes (Kwok *et al.*, 2004; Müller, 2004), escapar del fagosoma, inhibir la fusión del fagosoma con lisosomas (Gruenberg & van der Goot, 2006), o sobrevivir dentro del fagolisosoma (Dermine & Desjardins, 1999).

En el caso de *Bonamia* spp. se ha documentado la posible capacidad del parásito para inhibir la producción hemocitaria de ROS (Comesaña *et al.*, 2012; Hervio *et al.*, 1991; Morga *et al.*, 2009). La presencia de actividad fosfatasa ácida, enzima relacionada con el bloqueo de la producción de anión superóxido en neutrófilos de vertebrados (Remaley *et al.*, 1984), se ha detectado en las células de *Bonamia ostreae* (Hervio *et al.*, 1991) así como en otros parásitos de moluscos (Le Gall *et al.*, 1991; Volety & Chu, 1995) y podría estar relacionada con el mecanismo de evasión de estos microorganismos para combatir el sistema de defensa del hospedador. En el caso de *Ostrea chilensis*, las células de *Bonamia exitiosa* fagocitadas por los hemocitos liberan vesículas que se insertan en la membrana del fagosoma, modificando la membrana de la vacuola parasitófora, pudiendo evitar la fusión fagosoma-lisosoma o favorecer el transporte de nutrientes del hospedador al parásito (Hine & Wesney, 1994a). Estas vesículas podrían derivarse de los cuerpos lipídicos que realizarían varias funciones: liberar fosfatasa ácida (Hervio *et al.*, 1991) que se uniría a la superficie del parásito para bloquear la producción de anión superóxido, regular el tráfico de membrana a través de lípidos insaturados o intervenir en las funciones de nutrición del parásito a través de enzimas como la  $\beta$ -glicerofosfatasa.

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*)  
afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

Además al comparar la hemolinfa de ostras infectadas y ostras no infectadas se han observado diferencias en niveles de varias enzimas (Xue *et al.* 2000; da Silva *et al.* 2008b), así como cambios en la concentración y expresión proteica (Cao *et al.*, 2009; Cronin *et al.*, 2001). Morga *et al.* (2012), apuntaron la posibilidad de que *B. ostreae* inhiba la apoptosis de los hemocitos de la ostra, mecanismo de gran importancia en la defensa del hospedador contra el parásito (Gervais *et al.*, 2016). Existen varios trabajos enfocados a encontrar diferencias en la expresión de distintos genes hemocitarios que presentan un especial interés por estar implicados en diversas vías metabólicas relacionadas con el sistema inmune del molusco (Martín-Gómez *et al.*, 2012; Morga *et al.*, 2010, 2011a, 2011b, 2012, 2017). Aquellos genes cuya expresión varía como consecuencia de la infección por *B. ostreae* son cruciales para descifrar cuáles son las modificaciones que produce el parásito en los mecanismos de defensa de *O. edulis* permitiéndole



**Figura 5.** Hemocitos de *Ostrea edulis* parasitados por *Bonamia ostreae* (flechas). Imagen obtenida mediante citocentrifugación de una muestra de hemolinfa de una ostra infectada. Algunas células del parásito son binucleadas (flechas dobles) por encontrarse en proceso de división.

sobrevivir en su interior. A pesar del amplio número de trabajos realizados sobre esta interacción, todavía no se conoce al completo cuál es la estrategia que permite a *Bonamia* evitar los mecanismos de destrucción de los hemocitos de la ostra.

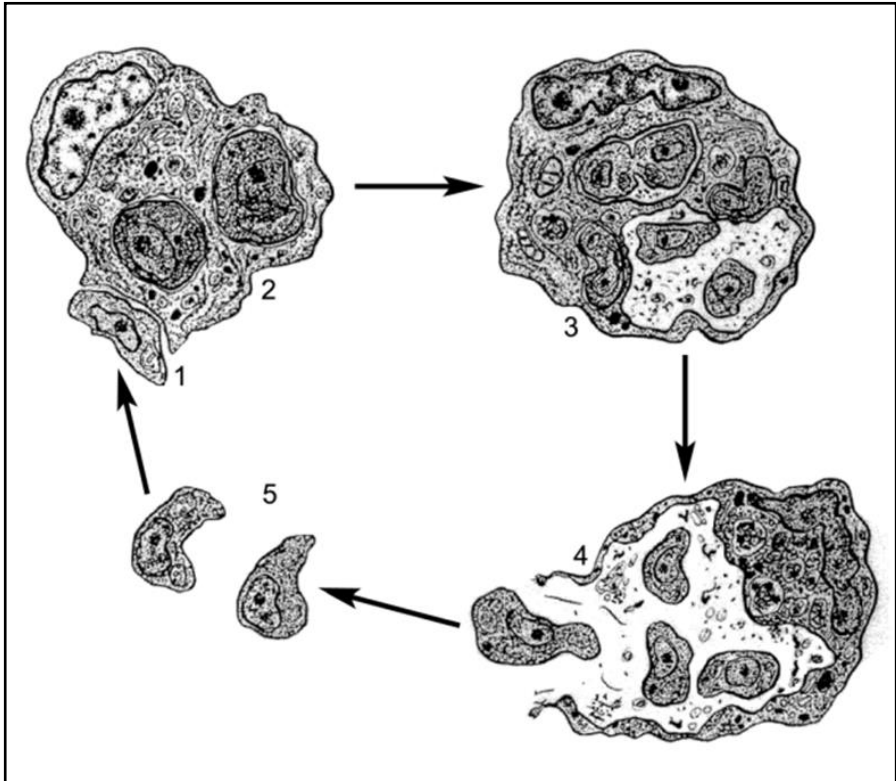
Los estadios de *B. ostreae* y *B. exitiosa* que se observan rutinariamente infectando a las ostras son células uni o binucleadas tanto intra como extracelulares (Figura 5), y más esporádicamente estadios plasmodiales multinucleados. Se pueden haber llegado a observar diez o incluso más de 20 parásitos en el interior de un hemocito infectado. Esta multiplicación celular conduce a la ruptura de la célula hospedadora, dejando a los parásitos libres por la hemolinfa para infectar otras células (Balouet *et al.*, 1983), reiniciando el ciclo infectivo y propagando así la infección por todo el animal (Figura 6). La ruptura de los hemocitos conlleva una infiltración hemocitaria intensa en el tejido conjuntivo de varios órganos (Comps, 1983).

Cuando el patógeno penetra en el hospedador, antes del desarrollo de la infección, existe un periodo de latencia en el que no es posible la observación de *B. ostreae* por técnicas histológicas (Culloty & Mulcahy, 1996; Grizel *et al.*, 1988; Montes *et al.*, 1991). Este periodo normalmente tiene una duración de 3-4 meses (Tigé & Grizel, 1984), pero los eventos ocurridos en él se desconocen.

Las ostras infectadas pueden presentar alteraciones macroscópicas, aunque la enfermedad no siempre es fácil de observar. Las lesiones más evidentes son hendiduras en el borde de las láminas branquiales, que llegan a ser profundas en los casos más avanzados de la enfermedad y perforaciones ulcerosas asociadas con decoloraciones amarillentas, principalmente en las branquias; en el manto y en la glándula digestiva también se pueden observar dichas decoloraciones. Microscópicamente se pueden observar lesiones en el tejido conjuntivo de branquias, manto y masa visceral, con infiltración intensa de hemocitos, lo que ocasiona una destrucción de la arquitectura normal de tejidos y órganos; en estado avanzado la infección llega a ser sistémica (Balouet *et al.*, 1983; Cochenec-

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*)  
afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

Laureau *et al.*, 2003a). Los síntomas se complementan con una falta de crecimiento e incremento de la mortalidad; aunque existen discrepancias sobre cómo afecta la infección al crecimiento y al índice de condición de las ostras. Se ha demostrado que en las etapas avanzadas, la infección altera el desarrollo gonadal de la ostra afectando a su fecundidad (da Silva *et al.* 2009).



**Figura 6.** Posible ciclo de infección del parásito *Bonamia ostreae* en los hemocitos de la ostra plana *Ostrea edulis*. La célula libre del protozoo (1) se adhiere a la superficie del hemocito (2), que lo engloba en un fagolisosoma donde desarrolla una fase proliferativa (3). Conforme las células del parásito aumentan de tamaño, se produce una destrucción del fagolisosoma y posteriormente del hemocito (4), liberando las células de *B. ostreae* al líquido intersticial (5), que inician nuevamente el ciclo. (Imagen obtenida de Montes *et al.* 1994).

La liberación de *Bonamia ostreae* y *B. exitiosa* del interior del hospedador al exterior se puede producir a través del digestivo, con las heces, por procesos de diapédesis a través de diferentes epitelios o cuando las ostras mueren. El parásito libre en el agua de mar es capaz de infectar otras ostras. La longevidad de las formas libres (fuera del hospedador) de *Bonamia* spp. no se conoce.

La transmisión de *B. ostreae* puede ocurrir durante todo el año (Culloty & Mulcahy, 1996), propagándose dentro de un amplio rango de temperaturas del agua, pero la prevalencia e intensidad de infección tienden a incrementarse en las épocas cálidas, concretamente a finales de la primavera y durante el verano (Culloty & Mulcahy, 1996; da Silva *et al.*, 2005; Tigé *et al.*, 1982). En general, las temperaturas altas promueven la expansión de la enfermedad mientras que las bajas ralentizan su transmisión (Grizel *et al.*, 1988). El efecto de la salinidad en el desarrollo de la enfermedad también se ha estudiado, detectando una mayor supervivencia del parásito a salinidades altas; se han observado infecciones en tanques con salinidades de hasta un 39‰ (Grizel *et al.*, 1988; Arzul *et al.*, 2009). La mortalidad del hospedador puede ser más o menos rápida en función de las condiciones ambientales.

*Ostrea edulis* es susceptible a *B. ostreae* en todas las etapas de su vida, pudiendo llegar a desarrollar una intensidad de infección alta incluso en edades tempranas (Lynch *et al.*, 2005), los estadios larvarios también pueden ser afectados por el parásito (Arzul *et al.*, 2011). Sin embargo, las ostras de aproximadamente 2 años son más susceptibles a la enfermedad (Culloty & Mulcahy, 1996; Robert *et al.*, 1991), siendo las últimas etapas del crecimiento una época crítica en el desarrollo, cuando las ostras alcanzan el tamaño comercial (Baud *et al.*, 1997; da Silva *et al.*, 2005). A esta edad la enfermedad se disemina más rápidamente y la prevalencia e intensidad de la infección, así como la mortalidad se incrementan notablemente. Por tanto, la talla y la edad del hospedador parecen ser factores intrínsecos importantes en el desarrollo de la bonamiosis (Cáceres-Martínez *et al.*, 1995; Culloty & Mulcahy, 1996; Figueras, 1991; Tigé *et al.*, 1982). También están relacionados otros factores importantes como la

maduración gonadal (da Silva *et al.*, 2009), factores estresantes (Cranfield *et al.*, 2005), entre ellos el estrés postpuesta, aumentando la infección en las hembras tras la puesta (Culloty & Mulcahy, 1996; Hine, 2002; Hine *et al.*, 2002) y la falta de alimento (Culloty & Mulcahy, 1996).

### 3.1.7 Técnicas de diagnóstico de *Bonamia* spp.

La gestión de la bonamiosis en poblaciones de *O. edulis*, tanto silvestres como cultivadas, depende de técnicas de diagnóstico de *Bonamia* spp. sensibles y fiables; de manera que se pueda llevar un control de la población y de la prevalencia de la enfermedad, detectando la presencia del parásito desde una infección temprana. Además, conocer con certeza cuáles son las zonas libres de *Bonamia* spp. para evitar la introducción de moluscos portadores del parásito es fundamental para el control de la enfermedad. Para el correcto diagnóstico de una enfermedad, la O.I.E. recoge en su "Manual de pruebas de diagnóstico para animales acuáticos" una serie de técnicas de detección para cada patógeno de la lista. En el caso de la bonamiosis estas técnicas son el análisis histopatológico, el análisis citológico y la técnica de PCR (O.I.E., 2006). Por su parte, la legislación europea recomienda una serie de procedimientos para el diagnóstico de *B. ostreae* recogidos en la Decisión de la Comisión 2015/1554 (<https://www.boe.es/doue/2015/247/L00001-00062.pdf>), entre los que se incluyen: improntas de corazón o branquias, histopatología, hibridación *in situ*, PCR y secuenciación.

El diagnóstico convencional de la infección por *Bonamia* spp. se realiza generalmente mediante técnicas de histología y citología; observando bajo microscopio óptico cortes histológicos y frotis de la hemolinfa y los órganos más afectados por la infección (corazón, branquia o glándula digestiva). Dentro de estas técnicas, el frotis de corazón y de hemolinfa son considerados los métodos más sensibles de detección de *Bonamia* spp. (da Silva & Villalba, 2004). Las técnicas tradicionales (histología y citología), requieren mucho tiempo, personal altamente capacitado y tienen baja sensibilidad (Corbeil *et al.*, 2006; da Silva & Villalba, 2004), por lo que



infecciones débiles podrían no ser detectadas, ya que el pequeño tamaño del parásito hace que sea difícil reconocer las infecciones subclínicas en secciones delgadas (Bucke, 1988; Carnegie *et al.*, 2000; Corbeil *et al.*, 2006; da Silva & Villalba, 2004; McArdle *et al.*, 1991). A pesar de presentar limitaciones importantes que hicieron necesario el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico más sensibles, estas técnicas son útiles para observar el estado general de la salud del molusco.

En un primer intento de mejora, se desarrollaron inmunoensayos para la detección de la infección por *Bonamia* spp. (Boulo *et al.*, 1989; Cochenec *et al.*, 1992; Mialhe *et al.*, 1988), pero dichos ensayos no mostraron una sensibilidad mayor respecto a técnicas histológicas. Además, los anticuerpos monoclonales diseñados para *Bonamia ostreae* de Europa apenas reaccionaron con *B. ostreae* de poblaciones de fuera de Europa (Carnegie *et al.*, 2000), por lo que se sugirió que las diferencias serológicas entre cepas podrían limitar la utilidad de las técnicas basadas en anticuerpos (Carnegie & Cochenec-Laureau, 2004).

Posteriormente, la aplicación de técnicas moleculares basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han permitido la detección de *Bonamia* spp. a partir de cantidades mínimas del ADN del parásito en ostras infectadas, amplificando fragmentos de la subunidad pequeña del ADN ribosómico del protozoo (Carnegie *et al.*, 2000; Cochenec *et al.*, 2000) (protocolos recomendados por OIE) con mayor rapidez e sensibilidad que el diagnóstico histológico o citológico (Carnegie *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 2005). Tanto dichos protocolos de PCR convencionales como los de PCRs en tiempo real (Q-PCR) (Corbeil *et al.*, 2006; Marty *et al.*, 2006), no permiten realizar una identificación específica del agente causal de la enfermedad. Recientemente, Ramilo *et al.* (2013) han publicado nuevos ensayos de PCR específicos para realizar un diagnóstico diferencial de *Bonamia ostreae* y de *B. exitiosa*, desarrollando ensayos por PCR convencional, Q-PCR y PCR multiplex. Es importante tener en cuenta que un resultado positivo de PCR no verifica la existencia de una infección, pudiendo tratarse de ingestión o transporte del



protozoo por parte de la ostra y no de parasitismo; de la misma manera, un resultado negativo de PCR no asegura la ausencia del parásito, ya que esta técnica analiza una cantidad ínfima de tejido en relación con el cuerpo de la ostra, lo que podría llevar a obtener falsos negativos. Recientemente se ha publicado un estudio donde se evalúa el uso de técnicas de PCR para el diagnóstico de *B. ostreae* en muestras de tejido de varios grupos de ostras *Ostrea chilensis*, considerando viable el uso de muestras de 5 ostras (Lane *et al.*, 2017).

Otra técnica molecular para el diagnóstico de *Bonamia* spp. es la Hibridación *in situ* (ISH). Los protocolos de ISH para la detección de *B. ostreae* (Carnegie *et al.*, 2003; Cochenec *et al.*, 2000) no son específicos y se ha comprobado que pueden hibridar con otros organismos. Hill *et al.* (2010) desarrollaron oligosondas específicas para el clado *B. exitiosa*-*B. roughleyi*, pero no evalúan la especificidad ni la sensibilidad de las mismas. Ramilo *et al.* (2014) han desarrollado una oligosonda para la detección específica de *B. exitiosa* mediante ISH, evaluando tanto la especificidad como la sensibilidad de la misma.

Para asegurar los resultados obtenidos en el diagnóstico de la bonamiosis, es recomendable una combinación de la técnica molecular de PCR con técnicas de observación microscópica de tejidos o células, como histología o hibridación *in situ*, evitando así posibles errores debidos a las limitaciones de cada técnica por separado (Burreson, 2008).

### 3.1.8 Control de la bonamiosis

La Organización Internacional de Sanidad Animal, también conocida como Oficina Internacional de Epizootias (O.I.E.) es el organismo internacional encargado de diseñar la política de control de las distintas enfermedades animales, intentando limitar su dispersión y evitar el origen de severas pérdidas ecológicas, económicas y/u ocasionar peligro para el ser humano. Como parte de su estrategia de control, se elabora una lista donde se incluyen las principales enfermedades de animales, las denominadas enfermedades de

declaración obligatoria (entre las que se encuentran las infecciones por *B. ostreae* y *B. exitiosa*), lo que obliga a un estado a notificar las detecciones que eventualmente se puedan producir de tales enfermedades en su territorio y a establecer un sistema de separación entre zonas libres y no libres de la enfermedad (O.I.E., 2007).

Debido a que las ostras se encuentran principalmente en áreas abiertas, y a que, como el resto de moluscos, carecen de anticuerpos, ningún tratamiento, incluida la posibilidad de desarrollar vacunas, puede ser utilizado para combatir esta enfermedad. El control de la bonamiosis se basa en la gestión de las zonas afectadas y en la restricción de la transferencia de ostras, por tanto, es fundamental limitar las introducciones o movimientos comerciales de individuos potencialmente portadores del patógeno desde zonas afectadas por la enfermedad hacia áreas libres de la misma, tal como se recoge en la Directiva 2006/88/EC.

A pesar de que no existe un tratamiento aplicable a ostras infectadas por *Bonamia* spp., diferentes estrategias se han llevado a cabo con el objetivo de erradicar o minimizar el efecto de esta enfermedad y recuperar los bancos naturales de ostras planas europeas (O.I.E., 2006). En Holanda, en un infructuoso intento de erradicar la enfermedad, las ostras se eliminaron minuciosamente y se prohibió el cultivo de ostras en las zonas afectadas (van Banning 1988; Van Banning 1991). En Francia, se llevó a cabo un plan que combinaba medidas profilácticas zootécnicas junto con intentos de erradicación (Grizel *et al.*, 1986), el efecto fue limitado y la industria de ostras francesa, optó por sustituir el cultivo de *O. edulis* (siendo los mayores productores de este molusco a nivel mundial) por otra especie de ostra no susceptible a bonamiosis, la ostra rizada *C. gigas*. En Galicia, la industria ostrícola se vio obligada a pasar a una estrategia de producción de engorde, que implica la introducción de semilla de ostra de otros países para crecimiento durante un período corto (menos de 1 año), y una cosecha anticipada, justo cuando se supera el tamaño mínimo comercial para evitar el máximo de mortalidad por bonamiosis (Montes *et al.*, 2003).

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*)  
afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

Estudios más recientes están relacionados con el desarrollo de líneas de *O. edulis* seleccionadas para la resistencia a *Bonamia* spp. (Carnegie & Cochenec-Laureau, 2004). Las poblaciones de *O. edulis* que han estado sometidas a una importante presión selectiva por parte del parásito desde los años 80 han conseguido desarrollar un cierto grado de resistencia a la infección por *Bonamia ostreae*, por lo que se considera la selección genética de esas ostras con mayor nivel de tolerancia a la enfermedad, como el mecanismo más importante de control de la enfermedad (Baud *et al.*, 1997; Culloty *et al.*, 2004; da Silva *et al.*, 2005; Naciri-Graven *et al.*, 1999; Lynch *et al.*, 2014).

El desarrollo de estirpes resistentes mediante cruzamientos programados ha tenido resultados alentadores con otras enfermedades de ostra, es el caso de enfermedades causadas por *Haplosporidium nelsoni* (Calvo *et al.*, 2003; Ford & Haskin, 1988; Frank-Lawale *et al.*, 2014) y *Perkinsus marinus* (Calvo *et al.*, 2003; Abbe *et al.*, 2010), la "enfermedad de la ostra juvenil" en *C. virginica* (Davis & Barber, 1999), la "mortalidad de verano" en *C. gigas* (Beattie *et al.*, 1988), las causadas por *Marteilia sydneyi* y *Mykrocytos roughleyi* en *Saccostrea glomerata* (Nell *et al.*, 2000; Dove *et al.*, 2013a, 2013b) y la infección por la microvariante del virus herpes tipo 1 de ostreidos (OsHV-1  $\gamma$  Var) en *C. gigas* (Dégremont *et al.*, 2015b, 2015c). Estos resultados, junto con los informes de una población natural de *O. edulis* en California con mayor grado de resistencia a bonamiosis en términos de supervivencia (Elston *et al.*, 1987), debido a la selección natural operada después de la exposición a la enfermedad de generaciones sucesivas de ostras; apoyaron la realización de programas de selección genética basados en cruzamientos controlados para paliar la infección por *Bonamia ostreae* en Irlanda (Culloty *et al.*, 2001, 2004; Lynch *et al.*, 2014), Francia (Baud *et al.*, 1997; Lallias *et al.*, 2008; Naciri-Graven *et al.*, 1999, 1998) y España (da Silva *et al.*, 2005; Villalba *et al.*, 2007). Los programas de selección han mostrado que la tolerancia a la bonamiosis es claramente heredable (Carnegie & Cochenec-Laureau, 2004). Los resultados obtenidos en estos programas son muy alentadores y, en mayor o menor medida, se ha conseguido aumentar la tolerancia, con disminución de la prevalencia e intensidad de la

enfermedad y de la mortalidad de las estirpes seleccionadas (Villalba & Figueras, 2011).

La selección de ostras menos susceptibles, tolerantes o resistentes a enfermedades no es un proceso complejo y constituye una de las estrategias más seguidas para luchar contra patologías de moluscos (Calvo *et al.*, 2003; Dégremont *et al.*, 2015a). Sin embargo, los programas de selección entrañan algunos inconvenientes. Por un lado, el desarrollo de una variedad tolerante o resistente a la enfermedad precisa un lapso de tiempo de varias generaciones para alcanzar un grado de tolerancia o resistencia trascendente. Por otro lado, las diferencias interanuales en la intensidad de infección, debidas a cambios de factores ambientales (temperatura, salinidad o disponibilidad de alimento) (Gaffney & Bushek, 1996), generan variaciones en la presión selectiva de la infección; así, una mayor supervivencia en un año podría deberse a condiciones ambientales adversas para el progreso de la infección y no al desarrollo de una mayor tolerancia. Una dificultad añadida para diseñar un programa de selección surge al intentar determinar las características idóneas de las variedades tolerantes. A veces, la selección de resistencia a una enfermedad conlleva el aumento de susceptibilidad a otros patógenos presentes en la zona o que llegan al cabo del tiempo, lo que supone la necesidad de desarrollar programas de selección de resistencia frente a varios patógenos (Frank-Lawale *et al.*, 2014; Azéma *et al.*, 2015, 2017; Proestou *et al.*, 2016). Aunque en los últimos años se han realizado numerosos trabajos destinados a conocer marcadores de *O. edulis* genéticos, bioquímicos, fisiológicos o inmunológicos; indicadores de tolerancia frente a *B. ostreae*, que permiten a las ostras luchar con mayor eficacia frente a la bonamiosis (Xue *et al.*, 2000; Cronin *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2009; Comesaña *et al.*, 2012; da Silva *et al.*, 2008b; Martín-Gómez *et al.*, 2012; Morga *et al.*, 2010, 2011a, 2011b, 2012, 2017; Gervais *et al.*, 2016; Pardo *et al.*, 2016) todavía quedan muchas preguntas sin resolver.

Para lograr entender en detalle la relación parásito-hospedador y las bases de la tolerancia del hospedador, es imprescindible el estudio del sistema inmune y los mecanismos específicos implicados en la

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*)  
afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

interacción y la lucha contra el parásito. Las diferencias en susceptibilidad a bonamiosis entre distintas estirpes de *O. edulis* podrían estar relacionadas con variaciones en sus sistemas de defensa (Cochennec *et al.*, 1995; Naciri-Graven *et al.*, 1998; Cochennec-Laureau *et al.*, 2003; Pardo *et al.*, 2016; Morga *et al.*, 2017). De manera que un mayor conocimiento de la interacción entre el sistema inmune de la ostra y el patógeno deberá ayudar a diseñar estrategias para minimizar el impacto de la enfermedad.

La primera prueba del uso de la electroforesis bidimensional en el ámbito del estudio de la interacción de *B. ostreae* con el sistema inmunitario de la ostra plana *O. edulis* ha demostrado su utilidad en este ámbito (Cao *et al.*, 2009).

Este capítulo recoge un estudio por el que, a través de un enfoque proteómico, se analizaron las diferencias en la expresión proteica de la hemolinfa entre ostras infectadas por *B. ostreae* o *B. exitiosa* y ostras no infectadas; para ello se utilizaron tres estirpes de ostras con diferente susceptibilidad a la bonamiosis: estirpes de ostras irlandesas y gallegas, ambas seleccionadas para la resistencia a la bonamiosis, y la estirpe de ostras gallegas no seleccionadas. Las ostras utilizadas en el estudio se cultivaron en áreas afectadas por bonamiosis en Galicia e Irlanda; las ostras de los dos estirpes gallegos compartieron las mismas condiciones ambientales a lo largo de toda su vida. Además, se comparó el perfil proteómico de la hemolinfa entre ostras no infectadas de los dos estirpes gallegos, tratando de identificar proteínas asociadas a la resistencia a la bonamiosis. Las proteínas de hemolinfa se separaron mediante electroforesis bidimensional (2-DE); a continuación se utilizó espectrometría de masas (MS) para identificar proteínas con expresión diferencial. Se identificaron treinta y cuatro proteínas implicadas en la interacción parásito-hospedador, de las cuales 7 podrían considerarse candidatos a marcadores de resistencia, para confirmarlo es necesario un estudio adicional.

## 3.2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.2.1 Estirpes de ostra utilizadas

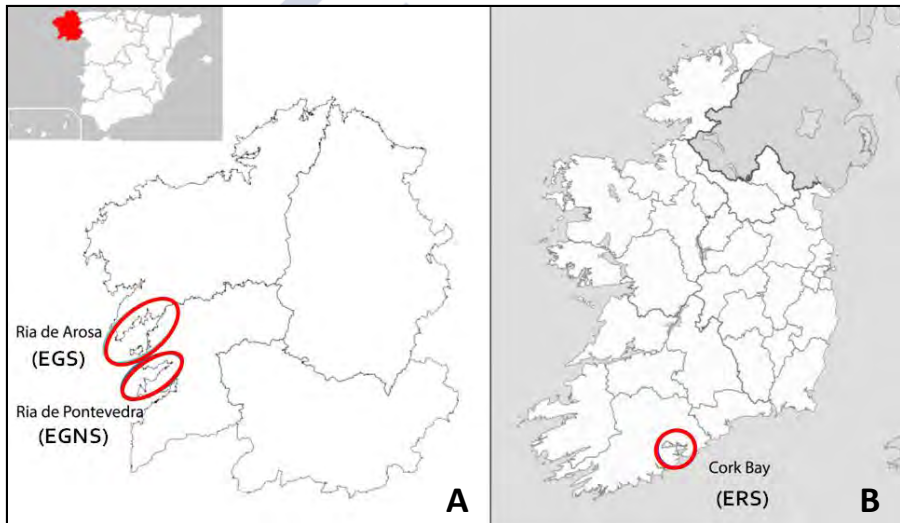
Para realizar este estudio se utilizaron ostras procedentes de tres estirpes de ostras *Ostrea edulis* con diferente susceptibilidad a bonamiosis. Una de ellas, la **estirpe gallega seleccionada (EGS)**, incluyó ostras que derivaban de un programa de selección genética dirigida a aumentar la resistencia de la ostra plana a la bonamiosis desarrollado en el Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA) (da Silva *et al.*, 2005; Villalba *et al.*, 2007) y formaban parte de la 3ª generación de selección de uno de los lotes que derivaban del banco natural de Coroso (Ribeira, Ría de Arousa, SO Galicia, España) (Figura 7). Otra estirpe, la **estirpe gallega no seleccionada (EGNS)**, derivó de ostras de ostras recogidas en un banco natural próximo a la Isla de Tambo, en la Ría de Pontevedra (Galicia, NO España) (Figura 7). La semilla de las dos estirpes gallegas fue producida simultaneamente en las instalaciones de criadero de moluscos del CIMA, en el verano de 2009, y posteriormente llevada a una batea del polígono de cultivos marinos de Cambados (Ría de Arousa) para continuar con su crecimiento. El polígono de engorde de ostra plana de Cambados es una zona afectada por los parásitos *B. ostreae* y *B. exitiosa* (Abollo *et al.*, 2008; Ramilo *et al.*, 2014). Por tanto, las ostras de ambas estirpes gallegas usadas en este estudio compartieron las mismas condiciones ambientales a lo largo de toda su vida, en criadero y batea. Por desgracia, ambas estirpes sufrieron mortalidad masiva causada por una infección por virus herpes inmediatamente después de ser transferidas del criadero a la batea (Villalba *et al.*, 2010), lo que interfirió en el plan de comparar el rendimiento en el engorde de ambas estirpes y desaconsejó extraer conclusiones sobre diferencias en la susceptibilidad a la bonamiosis entre las estirpes.

La tercera estirpe que se utilizó en la comparación fue la **estirpe rossmore seleccionada (ERS)**, que incluía ostras derivadas de un programa irlandés de selección genética, llevado a cabo por Atlantic Shellfish Ltd. desde 1988 (Culloty *et al.*, 2004, 2001). Como en el



Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*)  
afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

caso del programa de selección del CIMA, se trata de un programa cuyo objetivo es aumentar la resistencia de la ostra europea a la bonamiosis. Inicialmente estas ostras procedían de un banco natural de Rossmore, bahía de Cork (SE Irlanda) (Figura 7), zona afectada por el parásito *B. ostreae*. En ambos programas gallego e irlandés de selección genética, aquellos individuos supervivientes a bonamiosis fueron utilizados como progenitores de la siguiente generación, repitiendo el proceso a lo largo de generaciones sucesivas.



**Figura 7.** Localización de los bancos de las poblaciones de *Ostrea edulis* de los que provienen las estirpes de ostra plana utilizadas. Mapa de Galicia (NO España), donde se indica la ubicación de la Ría de Arosa y la Ría de Pontevedra (A). Mapa de Irlanda donde se muestra la ubicación de la Bahía de Cork (B).



### **3.2.2 Obtención de muestras de hemolinfa**

En mayo-junio de 2011, se tomaron 89 ostras EGS y 91 EGNS (2 años) de una batea en la ría de Arousa, y 100 ostras ERS (4 años) del banco de Rossmore, y se transportaron al laboratorio, donde se mantuvieron en tanques con flujo abierto de agua de mar de la ría de Arousa. Las ostras se analizaron tras una semana de aclimatación. La razón de la diferencia de edad entre las ostras gallegas e irlandesas utilizadas en el estudio es que el crecimiento de la ostra plana es más rápido en Galicia y la mortalidad alta por bonamiosis ocurre generalmente a una edad más joven que en Irlanda (Culloty & Mulcahy, 1996; da Silva et al., 2005). Se extrajo hemolinfa de todas las ostras de cada estirpe. La extracción de hemolinfa se realizó mediante punción directa en el músculo aductor con agujas de calibre 21 (3G) (40 x 0,8 mm) acopladas a jeringuillas de 1 ml de volumen. Para ello se abrieron las valvas de la ostra lo mínimo posible con cuidado para no desgarrar el músculo aductor, y se mantuvieron abiertas con una punta de pipeta durante la extracción permitiendo la observación de la punción en el músculo (Figura 8). La hemolinfa extraída se depositó individualmente en viales de fondo cónico de 1,5 ml rodeados de un baño de hielo picado para evitar la agregación de los hemocitos. A continuación se evaluó el grado de limpieza de la hemolinfa extraída mediante observación de una gota con microscopio óptico para asegurar la calidad de las muestras. Aquellas muestras de hemolinfa en que se observaron gametos, espiroquetas, ciliados, bacterias u otros elementos ajenos a la hemolinfa fueron desechadas. Además se evaluó la viabilidad celular con azul de tripano, para tener certeza de que los hemocitos estuvieran vivos. Las muestras de hemolinfa no contaminada se congelaron a -80°C.

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*) afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas



**Figura 8.** Separación de las valvas de un ejemplar de *Ostrea edulis* para extraer hemolinfa del músculo aductor (tejido blanquecino entre las dos valvas) con una jeringa de insulina.

### 3.2.3 Diagnóstico por PCR

De cada una de las ostras de la que se extrajo hemolinfa con éxito, se conservó un fragmento de branquia y otro de gónada en etanol al 96% para su posterior diagnóstico. Como método de diagnóstico de *Bonamia ostreae* y *B. exitiosa* se utilizó el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, siguiendo los protocolos descritos por Ramilo et al. (2013), utilizando el par de cebadores BOSTRE-F/R para *B. ostreae* y el par BEXIT-F/R para *B. exitiosa*. Los ensayos de PCR se realizaron en un volumen total de 25  $\mu$ l que contenía 1  $\mu$ l de ADN genómico (200 ng), tampón de PCR a una concentración 1x, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM nucleótidos (Roche Applied Science), 0,3  $\mu$ M de cada cebador específico para *B. ostreae* (BOSTRE-F / R) o *B. exitiosa* (BEXIT-F / R) y 0.025 U. $\mu$ l<sup>-1</sup> Taq ADN polimerasa (Roche Applied Science). En cada ensayo de PCR se usaron un control positivo para *B. ostreae* o *B. exitiosa* (ADN de una ostra infectada con *B. ostreae* o *B. exitiosa*) y un control negativo (sin

ADN). Los ensayos de PCR se realizaron en un termociclador de gradiente T (Biometra), bajo los siguientes parámetros de reacción: 94°C durante 2 minutos, 35 ciclos a una temperatura de fusión de 94°C durante 30 segundos, una temperatura de 55°C para *B. ostreae* y 58°C para *B. exitiosa* durante 45 segundos, una temperatura de extensión de 72°C durante 1 minuto, seguida de un período de extensión final de 72°C durante 1 minuto. Después de la PCR, se analizaron alícuotas de 10  $\mu$ l de ADN amplificado por electroforesis en geles de agarosa al 2%, en tampón EDTA de acetato de Tris al 1x, se tiñeron con bromuro de etidio y se escanearon en un sistema de documentación GelDoc XR (BioRad).

De acuerdo con las experiencias previas se desechó el análisis de muestras individuales de hemolinfa porque la cantidad total de proteína en la hemolinfa obtenida de algunas ostras habría sido inferior al mínimo requerido para una separación correcta de proteínas mediante electrophoresis bidimensional. En lugar del analisis individualizado se optó por agrupar muestras. Es cierto que al agrupar muestras de varios individuos se enmascara la variación individual pero fue el único planteamiento viable, lo que ocurre con frecuencia cuando se usa electrophoresis bidimensional (Monsinjon & Knigge, 2007). En base al diagnóstico de *Bonamia* spp. mediante PCR, las distintas muestras individuales de hemolinfa se mezclaron dando lugar a grupos con diagnóstico negativo y otros con diagnóstico positivo en cada estirpe, como se muestra en la Tabla 2. En todos los casos se seleccionaron las mejores muestras de hemolinfa en relación al volumen y a la densidad hemocitaria. En el caso de las ostras EGS, el número de casos positivos para *B. ostreae* (3 ostras) y para *B. exitiosa* (2 oysters) fueron mucho menores que en las ostras EGNS (8 ostras positivas para *B. ostreae*, 17 para *B. exitiosa*, y 3 para ambos parásitos); por ello, en el caso de ostras EGNS se prepararon grupos separados con hemolinfa de ostras positivas para cada especie de *Bonamia* (las 3 ostras positivas para ambos parásitos no se usaron), mientras que se prepare un solo grupo con hemolinfa de ostras ESS positivas para una especie u otra de *Bonamia*. En el caso de ostras ERS, no se detectó ningún caso positivo para *B. exitiosa* y se prepararon 3 grupos de hemolinfa diferentes: ostras negativas para

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*) afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

*Bonamia* spp., ostras con una señal positiva débil (una banda tenue en la electrophoresis con los amplicones de la PCR) para *B. ostreae* y ostras con señal positiva intensa (una banda intensa) para *B. ostreae* (Tabla 2).

**Tabla 2.** Grupos de las diferentes estirpes de *O. edulis* según los resultados obtenidos mediante PCR y número de individuos de los que consta cada grupo. (Cuando no se especifica la especie de *Bonamia*, el grupo está compuesto por ambas (*B. ostreae* y *B. exitiosa*)).

Estirpe	Grupo	Número de individuos por grupo (n)
Estirpe gallega seleccionada (EGS)	Ostras <i>Bonamia</i> -negativo	7
	Ostras <i>Bonamia</i> -positivo	5
Estirpe gallega no seleccionada (EGNS)	Ostras <i>Bonamia</i> -negativo	7
	Ostras <i>Bonamia ostreae</i> -positivo	7
	Ostras <i>Bonamia exitiosa</i> -positivo	7
Estirpe Rossmore Seleccionada (ERS)	Ostras <i>Bonamia</i> -negativo	7
	Ostras <i>B. ostreae</i> con señal positiva débil	5
	Ostras <i>B. ostreae</i> con señal positiva intensa	7

### 3.2.4 Extracción proteica

Las muestras congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se liofilizaron y se mantuvieron a esta temperatura hasta realizar la solubilización de las proteínas. Para llevar a cabo la extracción de proteínas globales, el liofilizado de hemolinfa se disolvió en tampón de lisis (7.6 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, trazas de azul de bromofenol, 0.2% anfolito, pH 3-10 y 100 mM DTT) y PMSF (inhibidor de proteasas) durante 2 horas y 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación. Pasado ese tiempo, el homogenado resultante se centrifugó a  $16.000\times g$  durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para eliminar residuos. Se recogió el sobrenadante, donde se encontraban las proteínas extraídas, y se determinó el contenido total de proteínas usando el kit RC DC Protein Assay (BioRad), basado en el protocolo de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). La muestra se purificó con un kit comercial ReadyPrep<sup>TM</sup> 2-DCleanup (BioRad), para eliminar sales y albúmina y, finalmente, un volumen de muestra con 500  $\mu\text{g}$  de proteína se resuspendió en 400  $\mu\text{l}$  de solución de rehidratación (7 M

urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, trazas de azul de bromofenol, 0.3% DTT y 0.5% IPG (gradiente de pH inmovilizado). Alicuotas de las muestras de proteínas se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 3.2.5 Electroforesis bidimensional 2-DE

Las diferentes proteínas presentes en las muestras se separaron por electroforesis bidimensional (2DE). La mayor parte de las proteínas de la hemolinfa de *O. edulis* tienen un punto isoeléctrico (pI) entre 5,0 y 8,0 (Cao *et al.*, 2009), por lo que se utilizaron tiras de pH de 5-8. En la primera dimensión o Isoelectroenfoque (IEF) se cargaron 500  $\mu\text{g}$  de proteína resuspendida en 400  $\mu\text{l}$  de solución de rehidratación en tiras de inmovilinas de gradientes de pH (IPGs) de 17 cm y pH 5-8. Las tiras de IPGs se colocaron con la matriz del gel en contacto con la muestra evitando la formación de burbujas y se cubrió con aceite mineral para evitar evaporaciones y prevenir la cristalización de la urea. El isoelectroenfoque se realizó en un aparato horizontal Protean®IEF de BioRad a  $20^{\circ}\text{C}$ . La rehidratación se llevó a cabo durante 12 horas, aplicando un voltaje de 50 V para favorecer la entrada en el gel de proteínas de alto peso molecular (Gorg *et al.*, 1999). Inmediatamente después de la rehidratación se inició el isoelectroenfoque con 500 V durante 1 hora y 30 minutos, seguidos de 1000 V durante 1 hora 30 min, 2000 V y 4000 V también durante 1 hora y 30 minutos y finalmente 8000 V hasta alcanzar un voltaje acumulado total de 52000 Vh. La corriente en ningún momento excedió los 50  $\mu\text{A}$  por tira. Una vez finalizado el isoelectroenfoque, se procedió al equilibrado de las tiras. En un primer paso se incubaron durante 15 minutos en una solución de DTT al 1% en tampón de equilibrado (6 M urea, 50 mM Tris, 2% SDS, 30% glicerol) para reducir las proteínas y, en un segundo paso, se incubaron otros 15 minutos en una solución de iodoacetamida al 2,5% en el mismo tampón. La iodoacetamina elimina el exceso de DTT evitando el vetado en los patrones electroforéticos. Entre la primera y la segunda dimensión las tiras se pueden conservar congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , tanto antes como después del proceso de equilibrado.

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*)  
afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

La segunda dimensión, electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), se llevó a cabo en geles al 12,5% de poliacrilamida (composición del gel: 30% acrilamida/bis 37.5:1, Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 10% SDS, 10% APS, TEMED y agua milli Q). La tira de IPG, una vez equilibrada, se colocó sobre la superficie del gel, donde también se añadieron marcadores de peso molecular conocido (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards de BioRad) y se selló con una solución de agarosa al 1% en tampón de electroforesis (electrolito: 25mM Tris base, 192 mM glicina, 0,1% SDS) y trazas de azul de bromofenol. Esta solución de sellado nos permitió visualizar el frente de la electroforesis. La segunda dimensión se realizó a una temperatura constante de 15°C, en una cubeta vertical Protean®Plus Dodeca Cell de BioRad, en la cual es posible la electroforesis de 12 geles simultáneamente manteniendo las mismas condiciones en todos ellos, por lo que la variabilidad entre las muestras es mucho menor. Las condiciones eléctricas de migración fueron 2,5 W por gel durante 30 minutos seguidos de 12,5 W por gel de 4 a 6 horas, hasta que el azul de bromofenol alcanzase el final del gel. Una vez finalizada la segunda dimensión se procedió a la tinción de los geles con una tinción de nitrato de plata compatible con espectrometría de masas (etanol al 50% [v/v], ácido acético al 1,2% [v/v] y formaldehído al 0,05% [v/v] durante 1 hora o durante la noche; etanol al 50% [v/v] durante 20 minutos [ $\times 3$ ]; tiosulfato sódico al 0,02% [p/v] durante 1 minuto; paso de lavado con H<sub>2</sub>O milli-Q durante 20 segundos [ $\times 3$ ]; nitrato de plata al 0,01% [w/v] durante 30 minutos; lavado con H<sub>2</sub>O milli-Q durante 1 minuto [ $\times 3$ ]; formaldehído al 0.05% [v/v], carbonato de sodio al 3% [p/v], tiosulfato de sodio al 0.02% [p/v] hasta la completa aparición de las marcas proteicas, y finalmente, EDTA al 1,5% [p/v] durante 10 minutos para detener la tinción). Se realizaron al menos 6 réplicas de cada grupo de hemolinfa; todas las réplicas de un mismo grupo se realizaron a la vez para asegurar condiciones idénticas. Los geles se digitalizaron en un *Scanner GS-800 Calibrated Densitometer* (BioRad) con una resolución de 63.5×63.5  $\mu$ m. Los geles originales se conservaron plastificados a 4°C.



### 3.2.6 Análisis de imagen y comparativa entre geles

El análisis de las imágenes digitalizadas de los geles se realizó de manera cualitativa con el programa informático PDQuest 8.0.1 (BioRad) en varios pasos: tras una detección de marcas proteicas automática, las imágenes fueron editadas manualmente eliminando las marcas proteicas erróneas (mal definidas, o presentes en los márgenes del gel donde hay una mayor inestabilidad del pH) y añadiendo aquellos que de manera automática no se habían detectado. De entre todas las réplicas realizadas para cada grupo se seleccionaron las 4 con mayor calidad, con las marcas proteicas mejor definidas y con el menor arrastre posible. Dentro de éstas, el mejor gel fue seleccionado como patrón para realizar un mapa sintético de proteínas o “master” donde se representan aquellas marcas proteicas comunes a todos los geles del mismo grupo. Para la elaboración de este mapa proteico se siguió una estrategia conservadora, descartando aquellas zonas que no estuvieran bien resueltas, marcas proteicas poco nítidas y zonas de solapamiento. Una vez realizada la detección manual de marcas proteicas se hizo una revisión detallada y se comprobó marca a marca que el emparejamiento en los distintos geles fuese correcto. Se constató una reproducibilidad alta entre las replicas de cada grupo de hemolinfa.

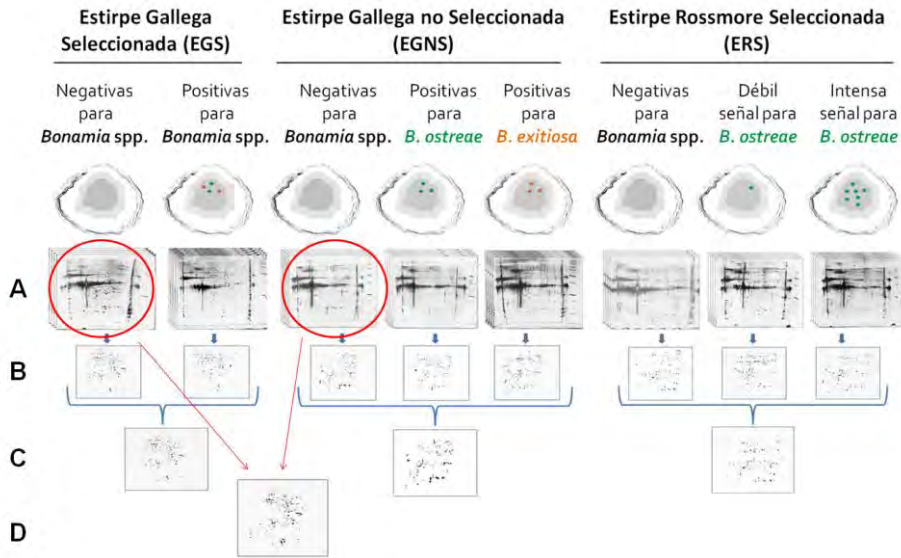
La Figura 9 muestra cómo se llevaron a cabo las comparaciones entre grupos de hemolinfa para cada estirpe. Una vez producido el mapa sintético representativo de cada grupo de hemolinfa, que incluía sólo las marcas proteicas comunes a todas las réplicas del grupo, se creó un gel sintético final para cada estirpe comparando los mapas sintéticos de cada grupo dentro de esa estirpe, discriminando las marcas exclusivas de cada grupo de hemolinfa y las marcas proteicas compartidas por todos los grupos de hemolinfa de la estirpe. Esta discriminación también se realizó con una estrategia conservadora, considerando como compartidas o exclusivas únicamente aquellas marcas que inequívocamente lo eran, eludiendo calificar las marcas proteicas sobre las que había alguna duda. Estas comparaciones permitieron evaluar diferencias en la expresión proteica entre los grupos de hemolinfa con diagnóstico diferente dentro de cada grupo.



Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*)  
afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

Las marcas caracterizadas como exclusivas de cada grupo de hemolinfa se consideraron como representativas del grupo y se seleccionaron y procesaron para su secuenciación e identificación tal como se describe en el apartado 3.2.7.

Además, se prestó una atención especial a las ostras de las dos estirpes gallegas en las que no se detectó *Bonamia* spp. a pesar de la presencia de *B. ostreae* and *B. exitiosa* en el área de cultivo donde permanecieron durante casi dos años. En concreto se comparó el mapas sintético representativo del grupo de hemolinfa de ostras EGS no infectadas con el mapa sintético representativo del grupo de hemolinfa de las ostras EGNS no infectadas; así se identificaron marcas proteicas compartidas por ambos grupos de hemolinfa y marcas proteicas exclusivas de cada uno de esos dos grupos de hemolinfa. Dado que las ostras de las dos estirpes gallegas compartieron las mismas condiciones ambientales durante toda su vida, las diferencias en expresión proteica entre las ostras no infectadas de EGS en comparación con las no infectadas de EGNS debían deberse en gran medida a diferencias genotípicas. Las ostras ERS no infectadas no se incluyeron en esta comparación porque crecieron en un ambiente muy distinto al de las ostras de las estirpes gallegas y, por tanto, discriminar la influencia de la estirpe y la infección de la influencia de las condiciones ambientales sobre los perfiles proteicos habría sido inviable. Debido a limitaciones presupuestarias, las marcas proteicas caracterizadas como exclusivas de cada grupo de hemolinfa en esta última comparación no se pudieron procesar para su secuenciación e identificación.



**Figura 9.** Esquema ilustrativo del análisis y la comparativa de geles de geles. A: Análisis de las réplicas de los geles de cada grupo de hemolinfa para producir un mapa sintético (“master”) representativo de grupo incluyendo sólo las marcas proteicas compartidas por las 4 réplicas del grupo. B: Comparación entre los mapas sintéticos representativos de grupos de hemolinfa dentro de cada estirpe. C: Mapa sintético final de cada estirpe en el que se discriminan las marcas proteicas compartidas por todos los mapas sintéticos representativos de grupos de hemolinfa y las marcas exclusivas del mapa sintético de cada grupo de hemolinfa de esa estirpe. D: Mapa sintético final resultante de la comparación entre el mapa sintético representativo del grupo de hemolinfa de las ostras EGS no infectadas y el mapa sintético del grupo de hemolinfa de las ostras EGNS no infectadas. EGS: estirpe gallega seleccionada. EGNS: estirpe gallega no seleccionada. ERS: estirpe Rossmore seleccionada.

Las diferencias entre estirpes en la distribución del número de marcas proteicas en función del diagnóstico se analizaron mediante comparaciones por pares usando tablas de contingencia 2 x 2 y el test de Fisher con la corrección de Bonferroni, en que el diagnóstico por PCR (positivo or negativo) se organizó en filas y las estirpes en columnas. El paquete informático IBM SPSS 20 se utilizó en el análisis estadístico.

### 3.2.7 Espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos

Las marcas proteicas seleccionadas en las comparaciones de geles se cortaron de los geles de origen de manera manual, en una campana de flujo laminar para evitar la contaminación de los mismos, y se enviaron al Centro Nacional de Biotecnología en Madrid, donde la identificación de proteínas se realizó automáticamente mediante el sistema GPS (Global Protein Server) acoplado a los datos del MALDI-TOF/TOF, combinando ambos tipos de espectros (MS-MS/MS) obtenidos para cada muestra y usando como motor de búsqueda MASCOT sobre bases de datos públicas de secuencias de proteínas (Blastp, NCBI) (Iglesias *et al.*, 2013). Después de este primer intento, se volvieron a picar de otros geles las marcas proteicas que no se consiguieron identificar y se enviaron al Servicio de Proteómica de la Fundación Ramón Domínguez (Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela) para realizar la secuenciación de los mismos. Para la identificación proteica se utilizó un enfoque de espectrometría láser de desorción/ionización por espectrometría de masas en tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) y MALDI-TOF/TOF digiriendo las marcas proteicas con tripsina (Shevchenko *et al.*, 1996). Los resultados de espectrometría de masas se obtuvieron en bucle automatizado usando el analizador 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems). Los datos de los espectros de masas de huella peptídica (PMF) y huella de fragmentos peptídicos (PFF) de cada muestra fueron combinados a través de GPS Explorer Software v3.6 (Applied Biosystems) usando Mascot software v2.1. (Matrix Science, Londres, Reino Unido) para realizar una búsqueda en las bases de datos no-redundantes de los taxones Mollusca, Alveolata y Rhizaria, integradas en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Maryland, EE. UU.). Las bases de datos de Alveolata y Rhizaria (grupos de protozoos, de los que el último incluye al género *Bonamia*) se incluyeron en la búsqueda para aumentar la probabilidad de identificación en caso de que algunas de las marcas proteicas seleccionadas en los geles correspondiese a *Bonamia*. Debido a la pobre cobertura de secuencias de proteínas y de ADN de *Ostrea edulis* en la base de datos, la mayoría de las proteínas fueron identificadas por secuenciación *de novo* y búsqueda de

similitud en BLAST siguiendo el procedimiento descrito por Liska y Shevchenko (2003). Todos los espectros MS/MS de una muestra se secuenciaron *de novo* utilizando Pro BLAST 1.4 software (Applied Biosystems) (Altschul *et al.*, 1997), las seis mejores secuencias de cada MS/MS se combina en un único formato de búsqueda de texto. A continuación, la cadena de búsqueda se presentó a MS BLAST búsqueda de similitud de secuencias, utilizando una versión del servidor BLAST Paracel software (Paracel, Pasadena, CA, EE.UU.). La relevancia de la identificación de proteínas se juzga mediante el algoritmo de puntuación MS BLAST; se aceptaron como correctas las identificaciones con puntuación  $\geq 50$  aunque los casos con puntuación menor pero con una coincidencia del 100% de la secuencia del fragmento peptídico obtenido también se aceptaron como correctos. Además, los patrones de fragmentación calculados a partir de las secuencias de péptidos asignados fueron emparejados contra datos MS/MS utilizando los enlaces proporcionados por Pro BLAST software. Sólo las proteínas emparejadas con un mínimo de tres secuencias de péptidos con al menos 20 residuos de aminoácidos idénticos se incluyeron en la lista de resultados, proporcionando criterios más rigurosos para la identificación de acuerdo con el protocolo de Jorge *et al.* (2005).

Asimismo se realizó una búsqueda similar utilizando la base de datos genómica y aminoacídica específica para *Ostrea edulis* creada por el Grupo Acuigen (Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Campus de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela), como parte del proyecto Oysterecover (Pardo *et al.*, 2016). Finalmente, se llevo a cabo una comprobación manual de cada proteína, asegurando así una identificación correcta.

### 3.3 RESULTADOS

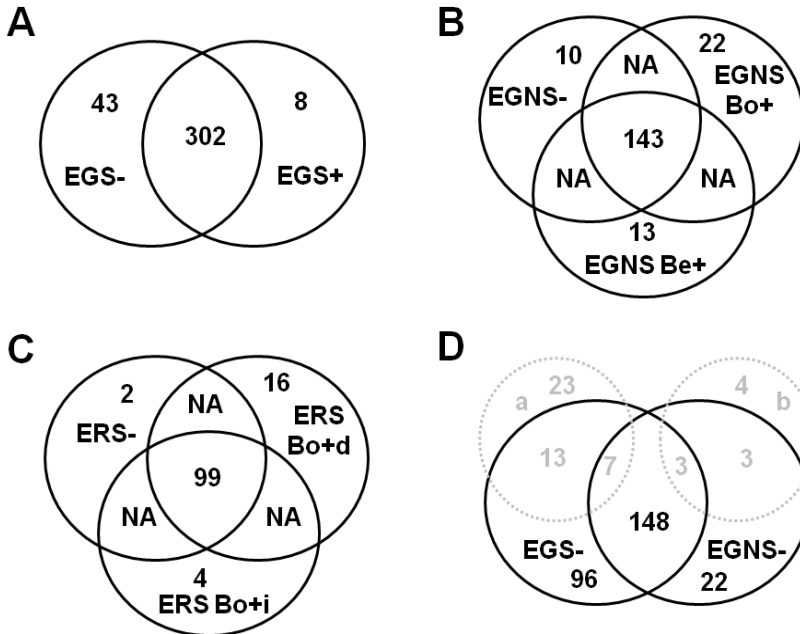
#### 3.3.1 Comparación entre los grupos de hemolinfa de cada estirpe

##### 3.3.1.1 Estirpe gallega seleccionada

Se prepararon dos grupos de hemolinfa a partir de ostras de la estirpe gallega seleccionada (EGS). Uno de ellos correspondía a ostras con PCR negativa para ambas especies de *Bonamia*, con una media de 804 marcas proteicas por gel, de las que 495 eran comunes a todas las réplicas. El otro grupo de hemolinfa correspondía a ostras con PCR positiva para una u otra especie de *Bonamia*, con 707 marcas proteicas de media por gel, de las que 381 eran comunes a todas las réplicas (Figura 10A, 11 y 12). Al comparar los 2 grupos de esta estirpe se pudieron detectar 302 marcas proteicas compartidas por los dos grupos, 43 marcas exclusivas de la hemolinfa del grupo PCR negativo y 8 marcas exclusivas del grupo PCR positivo (Figuras 10A y 11). Estos resultados se resumen en la tabla 3.

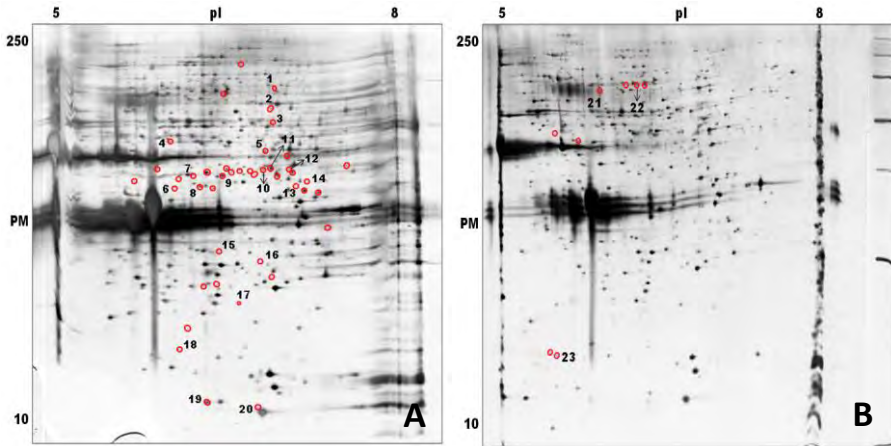
**Tabla 3.** Resumen del análisis de geles 2-D de la estirpe EGS, donde se incluye el diagnóstico por PCR de *Bonamia* spp., el número medio de marcas proteicas en los 4 geles de cada grupo de hemolinfa, el número de marcas comunes a las 4 réplicas de cada grupo y el número de marcas comunes y específicas en la comparación entre el grupo de hemolinfa positivo por PCR a una u otra especie de *Bonamia* y el grupo de hemolinfa negativo.

Diagnóstico de <i>Bonamia</i> spp.	Nº medio de marcas en los 4 geles	Nº de marcas comunes a las 4 réplicas de cada grupo	Comparación entre grupos	
			Nº marcas comunes	Nº marcas exclusivas
Negativo	804	495	302	43
Positivo para <i>Bonamia</i> spp.	707	381		8

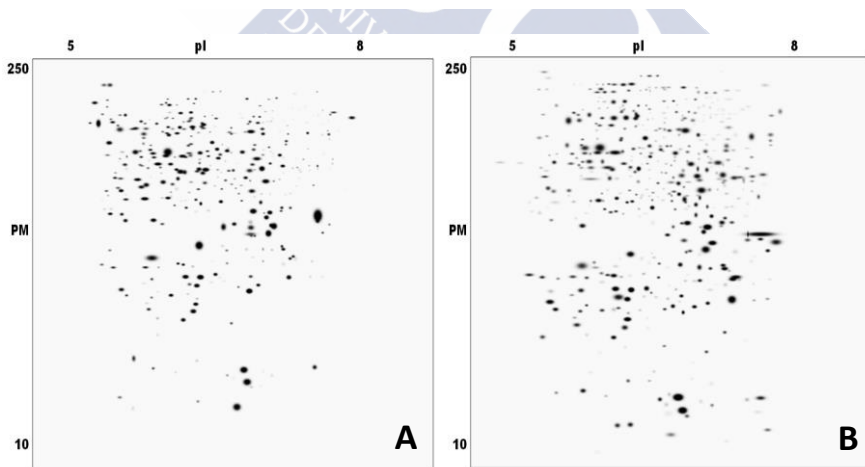


**Figura 10:** Diagramas de Venn que resumen las comparaciones de los patrones de marcas proteicas entre los mapas sintéticos representativos de los diferentes grupos de hemolinfa, mostrando el número de marcas proteicas exclusivas de cada grupo y el número de marcas proteicas compartidas por todos los grupos en cada comparación. A: Comparación entre el grupo de hemolinfa negativo para *Bonamia* spp. de la estirpe gallega seleccionada (EGS-) y el grupo positivo para una u otra especie de *Bonamia* de esta misma estirpe (EGS+). B: Comparación entre el grupo de hemolinfa negativo para *Bonamia* spp. de la estirpe gallega no seleccionada (EGNS-), el grupo positivo para *Bonamia ostreae* de esta misma estirpe (EGNS Bo+) y el grupo positivo para *Bonamia exitiosa* de esta misma estirpe (EGNS Be+). C: Comparación entre el grupo de hemolinfa negativo para *Bonamia* spp. de la estirpe Rossmore seleccionada (ERS-), el grupo con señal positiva débil para *B. ostreae* de esta misma estirpe (ERS Bo+d) y el grupo con señal positiva intensa para *B. exitiosa* de esta misma estirpe (ERS Bo+i). D: Comparación entre los grupos negativos para *Bonamia* spp. de las dos estirpes gallegas (EGS- y EGNS-); en este caso los números en gris corresponden a la distribución de las 43 marcas proteicas consideradas exclusivas de EGS- en la comparación A (círculo gris a) y la de las 10 marcas consideradas exclusivas de EGNS- en la comparación B (círculo gris b). NA: no analizado.

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*)  
afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas



**Figura 11.** Geles bidimensionales representativos de las proteínas de los grupos de hemolinfa de *Ostrea edulis* de la estirpe EGS. La imagen A corresponde al grupo no infectado y la B corresponde al grupo positivo por PCR a una u otra especie de *Bonamia*. Los círculos rojos indican aquellas marcas proteicas exclusivas de cada grupo. Los números sobre los geles corresponden al código de las proteínas identificadas (Tablas 8 y 9). pl: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.



**Figura 12.** Mapas sintéticos con las marcas proteicas comunes a los cuatro geles réplica de cada grupo de hemolinfa de *Ostrea edulis* de la estirpe EGS. A: Grupo negativo por PCR a *Bonamia* spp. B: Grupo positivo por PCR a una de las dos especies de *Bonamia* spp. El peso molecular (PM) y el punto isoeléctrico (pl) se indican en los ejes vertical y horizontal respectivamente.



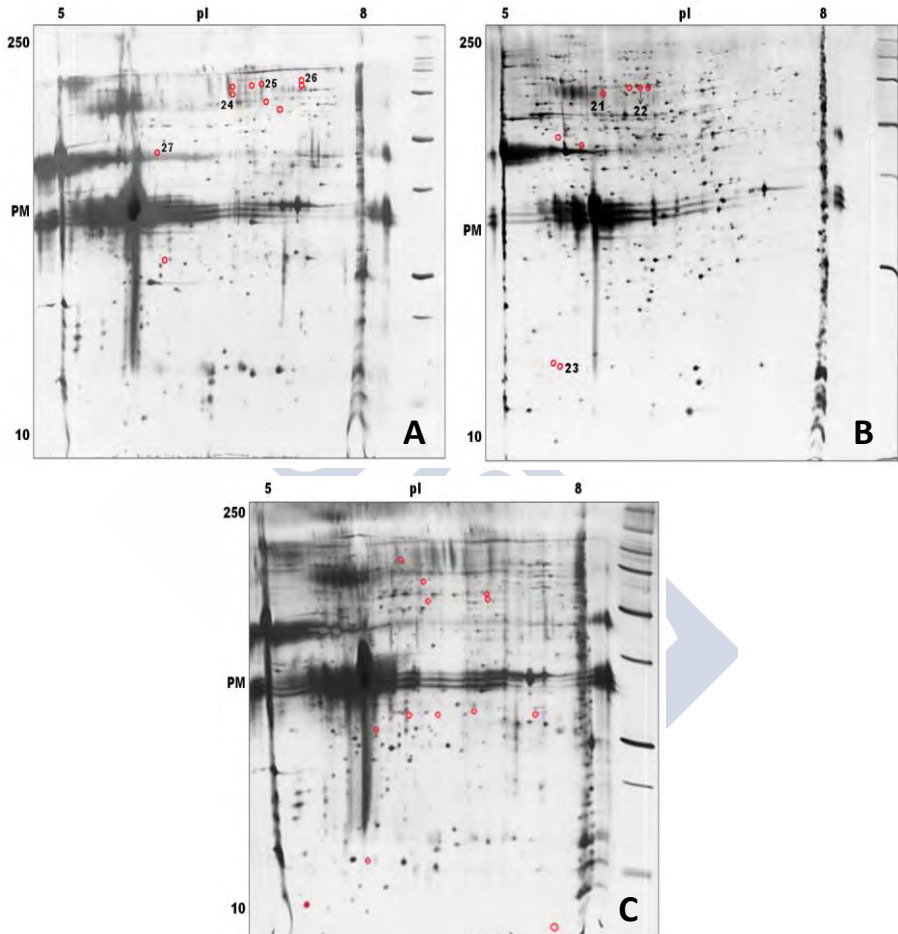
### 3.3.1.2 Estirpe gallega no seleccionada

Las muestras de la estirpe gallega no seleccionada (EGNS) se dividieron en tres grupos de hemolinfa. En el grupo con PCR negativa para ambas especies de *Bonamia* hubo una media de 434 marcas proteicas por gel (Figura 13A), con 272 compartidas por todas las réplicas (Figuras 10B y 14A). El grupo positivo por PCR para *B. ostreae* mostró una media de 505 marcas proteicas por gel (Figura 13B), con 258 marcas compartidas por todas las réplicas (Figuras 10B y 14B). Por último, el grupo positivo para *B. exitiosa* presentó un número medio de marcas proteicas de 533 por gel (Figura 13C), con 297 marcas comunpartidas por todas las réplicas (Figuras 10B y 14C). La comparación entre los mapas sintéticos representaivos de cada grupo mostró 143 marcas proteicas compartidas por los tres grupos, 10 marcas exclusivas del grupo PCR negativo, 22 marcas exclusivas del grupo positivo para *B. ostreae* y 13 marcas exclusivas del gerupo positivo para *B. exitiosa* (Figuras 10B y 13). Estos resultados se resumen en la Tabla 4.

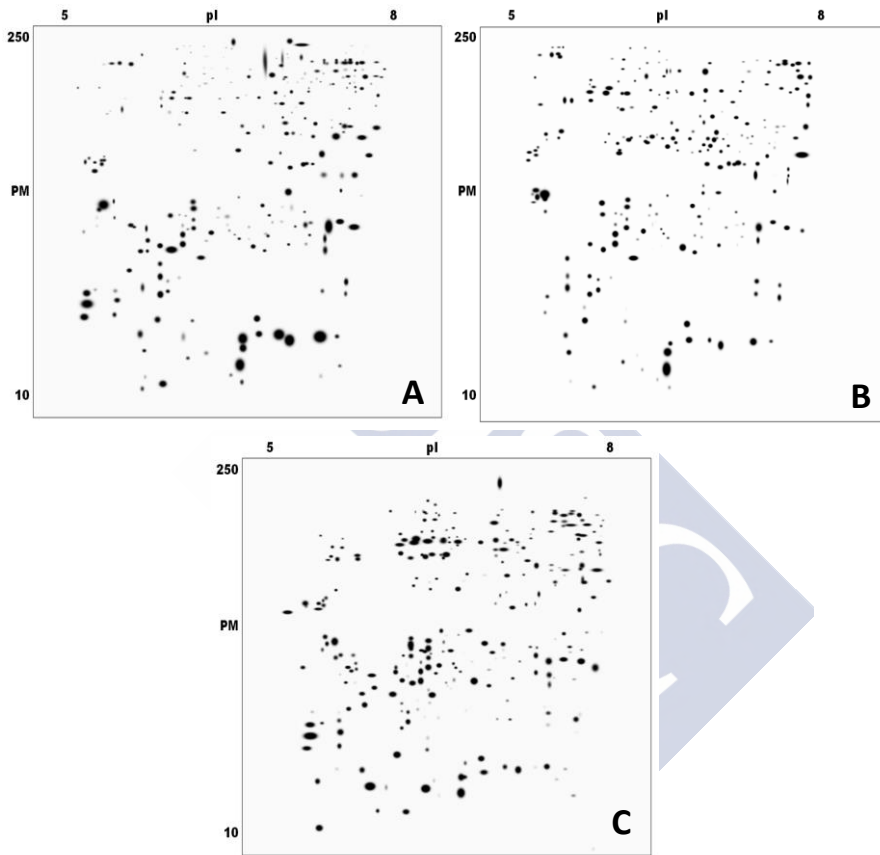
**Tabla 4.** Resumen del análisis de geles 2-D de la estirpe EGNS, donde se incluye el diagnóstico por PCR de *Bonamia* spp., el número medio de marcas proteicas en los 4 geles de cada grupo de hemolinfa, el número de marcas comunes a las 4 réplicas de cada grupo y el número de marcas comunes y específicas en la comparación entre grupos PCR negativos y positivos para *B. ostreae* y para *B. exitiosa*.

Diagnóstico de <i>Bonamia</i> spp.	Nº medio de marcas en los 4 geles	Nº de marcas comunes a las 4 réplicas de cada grupo	Comparación entre grupos	
			Nº marcas comunes	Nº marcas exclusivas
Negativo	434	272	143	10
Positivo para <i>B. ostreae</i>	505	258		22
Positivo para <i>B. exitiosa</i>	533	297		13

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*)  
afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas



**Figura 13.** Geles bidimensionales representativos del patrón proteico de los grupos de hemolinfa de *Ostrea edulis* la estirpe EGNS. A: Grupo PCR negativo. B: Grupo positivo para *Bonamia ostreae*. C: Grupo positivo para *Bonamia exitiosa*. Los círculos rojos indican aquellas marcas proteicas exclusivas de cada grupo. Los números sobre los geles corresponden al código de las proteínas identificadas (Tablas 10 y 11). pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.



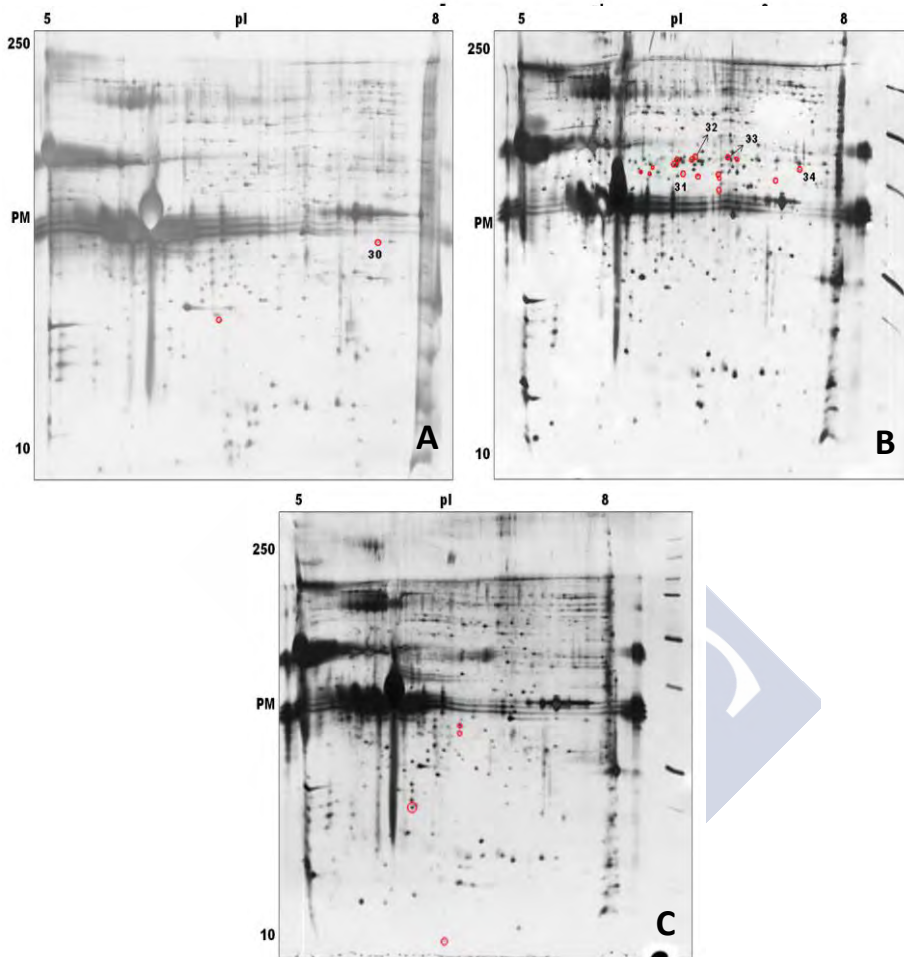
**Figura 14.** Mapas sintéticos con las marcas proteicas comunes a los cuatro geles réplica de cada grupo de hemolinfa de *Ostrea edulis* de la estirpe EGNS. A: Grupo negativo por PCR para *Bonamia* spp. B: Grupo positivo para *Bonamia ostreae*. C: Grupo positivo para *Bonamia exitiosa*. El peso molecular (PM) y el punto isoeléctrico (pI) se indican en los ejes vertical y horizontal respectivamente.

### 3.3.1.3 Estirpe Rossmore Seleccionada

En el caso de la estirpe Rossmore seleccionada (ERS) se prepararon tres grupos de hemolinfa. El grupo negativo por PCR a ambas especies de *Bonamia* presentó una media de 321 marcas proteicas por gel (Figura 15A), con 150 marcas compartidas por las 4 réplicas (Figuras 10C y 16A). En el grupo con señal positiva débil por PCR a *B. ostreae* se detectaron 622 marcas proteicas de media por gel (Figura 15B), con 365 marcas compartidas por todos los geles del grupo (Figuras 10C y 16B). El grupo con señal positiva intensa por PCR a *B. ostreae* mostró una media de 526 marcas por gel (Figura 15C), con 203 marcas compartidas por la cuatro réplicas (Figuras 10C y 16C). La comparación entre los mapas sintéticos representativos de cada grupo de esta estirpe mostró 99 marcas proteicas comunes a los tres grupos, 2 marcas exclusivas del grupo negativo por PCR, 16 marcas exclusivas del grupo con señal débil a *B. ostreae* y 4 marcas exclusivas del grupo con señal intensa a *B. ostreae* (Figuras 10C y 15). Estos resultados se resumen en la Tabla 5.

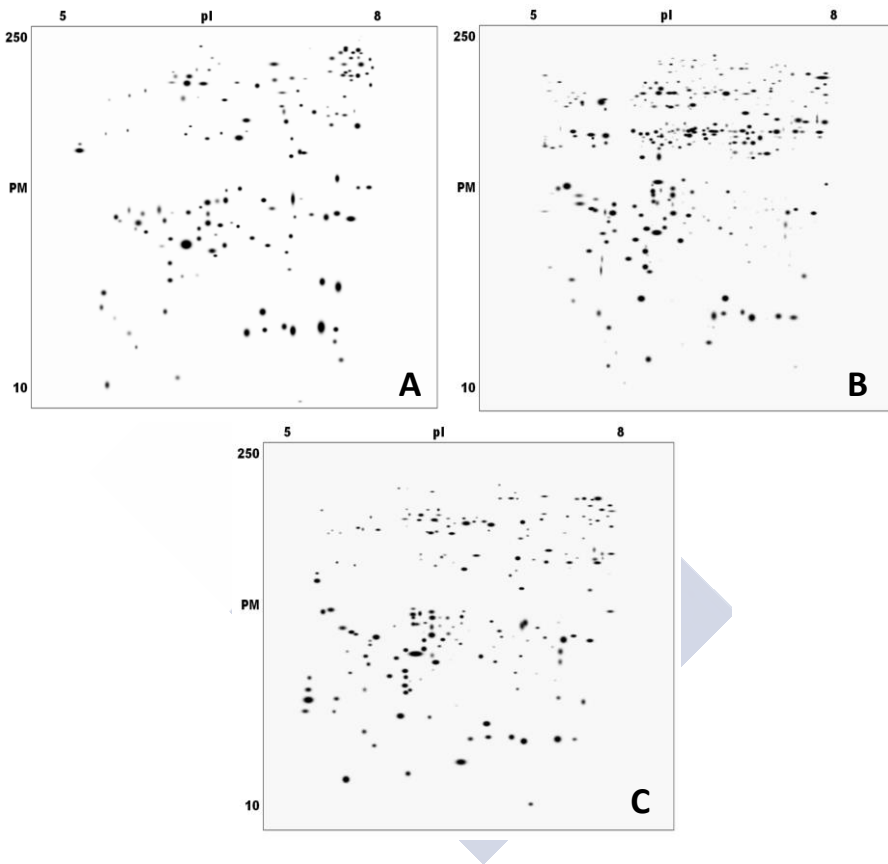
**Tabla 5.** Resumen del análisis de geles 2-D de la estirpe ERS, donde se incluye el diagnóstico por PCR de *Bonamia* spp., el número medio de marcas proteicas en los 4 geles de cada grupo de hemolinfa, el número de marcas comunes a las 4 réplicas de cada grupo y el número de marcas comunes y específicas en la comparación entre los grupos de hemolinfa con distinto diagnóstico por PCR.

Diagnóstico de <i>Bonamia</i> spp.	Nº medio de marcas en los 4 geles	Nº de marcas comunes a las 4 réplicas de cada grupo	Comparación entre grupos	
			Nº marcas comunes	Nº marcas exclusivas
Negativo	321	150	99	2
Positivo débil para <i>B. ostreae</i>	622	365		16
Positivo intenso para <i>B. ostreae</i>	526	203		4



**Figura 15.** Geles bidimensionales representativos de las proteínas expresadas en los grupos de hemolinfa de *Ostrea edulis* de la estirpe a ERS. A: Grupo PCR negativo para *Bonamia* spp. B: Grupo con señal positiva débil para *Bonamia ostreae*. C: Grupo con señal intensa para *B. ostreae*. Los círculos rojos indican aquellas marcas proteicas exclusivas de cada grupo. Los números sobre los geles corresponden al código de las proteínas identificadas (Tablas 12 y 13). pI: punto isoelectrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*)  
afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas



**Figura 16.** Mapas sintéticos con las marcas proteicas comunes a los cuatro geles réplica de cada grupo de hemolinfa de *Ostrea edulis* de la estirpe ERS. A: Grupo negativo por PCR para *Bonamia* spp. B: Grupo con señal débil para *Bonamia ostreae*C: Grupo con señal intensa para *B. ostreae*. El peso molecular (PM) y el punto isoeléctrico (pI) se indican en los ejes vertical y horizontal respectivamente.

### **3.3.2. Comparación entre estirpes en la distribución del número de marcas proteicas dependiendo del diagnóstico por PCR**

Se detectaron diferencias significativas en la distribución del número de marcas proteicas dependiendo del diagnóstico por PCR (positivo o negativo) en las comparaciones EGS – EGNS ( $P = 0,002$ ), EGS – ERS ( $P < 0,001$ ) y EGNS – ERS ( $P < 0,001$ ). Hay que resaltar que el grupo de hemolinfa negativo de la estirpe EGS mostró un número de marcas mayor que los grupos positivos de dicha estirpe mientras que los grupos de hemolinfa negativos de las estirpes EGNS y ERS mostraron un número de marcas menor que el de los grupos positivos de la estirpe respectiva.

### **3.3.3 Comparación entre los grupos de ostras sin infección de las estirpes gallegas**

Al comparar los grupos de hemolinfa de las ostras libres de infección de las dos estirpes gallegas se detectaron 158 marcas proteicas comunes a ambos grupos. En el caso de EGNS, 25 marcas fueron exclusivas de este grupo, mientras que en el caso de EGS, el número de marcas exclusivas fue sensiblemente mayor, 109. Las marcas exclusivas de ambos grupos se muestran en la Figura 17 y la Tabla 6 resume dicho análisis. Entre las 158 marcas proteicas compartidas por ambos grupos, 7 de ellas correspondían a marcas que se habían considerado exclusivas del grupo EGS negativo para *Bonamia* spp. al compararlo con el grupo EGS positivo para una u otra especie de *Bonamia* y otras 3 de ellas correspondían a marcas proteicas que se habían considerado exclusivas del grupo EGNS negativo para *Bonamia* spp. al compararlo con los grupos EGNS positivos. Entre las 109 marcas proteicas consideradas exclusivas del grupo EGS negativo para *Bonamia* spp. al compararlo con el grupo EGNS negativo, 13 de ellas correspondían a marcas que se habían considerado exclusivas del grupo EGS negativo al compararlo con el grupo EGS positivo. Por otro lado, entre las 25 marcas consideradas exclusivas del grupo EGNS negativo para *Bonamia* spp. al compararlo

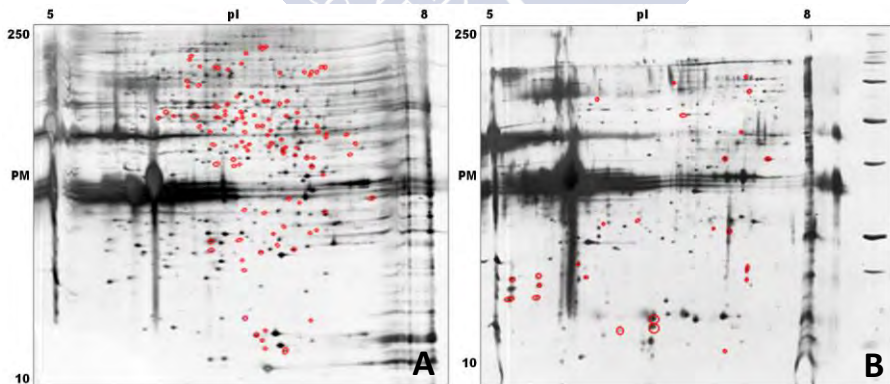


Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*)  
afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

con el grupo EGS negativo, 3 de ellas correspondían a marcas que se habían considerado exclusivas del grupo EGNS negativo al compararlo con los grupos EGNS positivos (Figura 10D).

**Tabla 6.** Resumen de la comparación entre los mapas sintéticos representativos de los grupos de hemolinfa de ostras con PCR negativo para *Bonamia* spp. de las dos estirpes gallegas, EGS y EGNS.

Estirpe	Comparación entre grupos	
	Nº marcas comunes	Nº marcas exclusivas
EGS	158	109
EGNS		25



**Figura 17.** Geles bidimensionales representativos del patrón proteico de los grupos de hemolinfa de ostras *Ostrea edulis* de las estirpes EGS (A) y EGNS (B) con PCR negativa para *Bonamia* spp. Los círculos rojos indican aquellas marcas exclusivas de cada grupo. pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.

### 3.3.4 Identificación proteica

Todas las marcas proteicas que se consideraron exclusivas de un grupo de hemolinfa en las comparaciones entre grupos de hemolinfa dentro de cada estirpe se procesaron para su secuenciación e identificación; en total fueron 118 marcas proteicas con variable peso molecular, pH e intensidad (Tabla 7). Lamentablemente no todas las marcas proteicas secuenciadas fueron identificadas pues parte de las secuencias de algunas de ellas no se correspondieron con ninguna secuencia de las proteínas incluidas en las bases de datos utilizadas (Tabla 7). Las Tablas 8-13 incluyen las proteínas identificadas correspondientes a cada grupo de hemolinfa. Lamentablemente no se consiguió la identificación de ninguna proteína exclusiva perteneciente a los grupos EGNS positivo para *B. exitiosa* y ERS con señal intensa para *B. ostreae*. La ubicación de las marcas proteicas correspondientes a las proteínas identificadas de los grupos de hemolinfa de EGS, EGNS y ERS se muestra en las Figuras 11, 13 y 15, respectivamente.

**Tabla 7.** Resumen de la comparación entre los mapas sintéticos representativos de los grupos de hemolinfa dentro de cada estirpe de ostras *Ostrea edulis* usadas en el estudio. Se incluye el número de marcas proteicas consideradas exclusivas de cada grupo de hemolinfa y el número y porcentaje (entre paréntesis) de estas marcas en las que se identificó una proteína.

Estirpe	Diagnóstico de <i>Bonamia</i> spp.	Comparación entre grupos		
		Nº marcas comunes	Nº marcas exclusivas	Nº marcas identificadas (%)
EGS	Negativo	302	43	20 (47)
	Positivo para <i>Bonamia</i> spp.		8	3 (38)
EGNS	Negativo	143	10	4 (40)
	Positivo para <i>B. ostreae</i>		22	2 (9)
	Positivo para <i>B. exitiosa</i>		13	0 (0)
ERS	Negativo	99	2	1 (50)
	Positivo débil para <i>B. ostreae</i>		16	4 (25)
	Positivo intenso para <i>B. ostreae</i>		4	0 (0)

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*)  
afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

Como se indicó en la sección 3.2.6. no se pudo abordar la identificación de las proteínas consideradas exclusivas de grupo al comparar los mapas sintéticos representativos de los grupos de hemolinfa de las ostras no infectadas de las dos estirpes gallegas. No obstante se constató que 7 de las 109 marcas proteicas exclusivas del grupo de ostras EGS no infectadas correspondían a las marcas proteicas en las que se identificaron las proteínas con los códigos 1, 3, 5, 10, 12, 14 and 17 de la Tabla 8, mientras que 2 de las 25 marcas exclusivas de las ostras EGNS no infectadas correspondían a las marcas proteicas en las que se identificaron las proteínas con los códigos 24 y 26 de la Tabla 9.



**Tabla 8.** Lista de proteínas identificadas del grupo de hemolinfa de ostras *Ostrea edulis* de la estirpe EGS negativo para *Bonamia*-spp. pi: punto isoeléctrico. PM: peso molecular. Teo: Valor teórico. Exp: valor experimental. SCORE: mejor alineamiento entre la longitud de la secuencia obtenida y la secuencia presente en la base de datos NCBI después de la búsqueda BLAST (a mayor score, mejor emparejamiento). E-VALUE: es el número de alineaciones distintas, con una puntuación igual o mejor que el Score, que se espera que ocurra por azar en una búsqueda en la base de datos (a menor E-value, mejor emparejamiento). SECUENCIA: únicamente se muestra la secuencia con mejor emparejamiento en la base de datos. Emparejamiento (%): número de aminoácidos de la secuencia proteica que corresponde a los péptidos y porcentaje de coincidentes.

CODIGO	PROTEINA	NÚMERO DE ACCESO NCBI	PM (Teo) / (Exp)	PI (Teo) / (Exp)	FUNCIÓN BIOLÓGICA	E-VALUE	SCORE NCBI	SECUENCIA	EMPAREJAMIENTO (%)
1	Citocromo C oxidasa subunidad I, parcial (mitocondrial) [ <i>Chelidonura berolina</i> ]	AFR24232.1	23,65/80	5,26/6,67	Cadena respiratoria, Metabolismo energético	0,088	29,1	GPIAHGSSS	9/9 (100%)
2	Proteína del complejo T subunidad 1- $\alpha$ [ <i>Crassostrea gigas</i> ]	EKC42768.1	75,32/67,68	6,82/6,64	Chaperona	2e-21	89,3	KSVVPGGGAV EAALSIYLENF ATSLGSRE	29/29 (100%)
3	Similar a adenosuccinato sintetasa [ <i>Crassostrea virginica</i> ]	XP_022333667.1	48,60/60,98	6,09/6,65	Biosíntesis de purinas	3e-05	42,6	KNYDSFPALDE DLCL	12/12 (100%)
4	Proteína homóloga a Lupus La [ <i>C. virginica</i> ]	XP_022320812.1	48,50/51,22	5,49/5,98	Procesamiento de ARN	1e-09	54,9	RNPDMSPENT EERRN	15/16 (94%)
5	Factor de iniciación eucariótico 4A-III [ <i>C. gigas</i> ]	EKC18878.1	137,9/48,1	6,79/6,58	Biosíntesis proteica	5e-23	96,9	KVILALGDYMS VQCHACIGGT NIGDDIRK	29/29 (100%)

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*) afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

CODIGO	PROTEINA	NÚMERO DE ACCESO NCBI	PM (Teo) / (Exp)	PI (Teo) / (Exp)	FUNCIÓN BIOLÓGICA	E-VALUE	SCORE NCBI	SECUENCIA	EMPARE-JAMIENTO (%)
6	Similar a NADH-ubiquinona oxidoreductasa (subunidad 75kDa) mitocondrial [ <i>C. gigas</i> ]	XP_022305803.1	80,41/38,70	5,84/5,96	Metabolismo energético	1e-13	68.1	KNPQVLFML GADEGLTRD DLPKD	21/25 (84%)
7	ARN helicasa p47 [ <i>C. gigas</i> ]	AAK85400.1	50,70/42,70	7,62/6,09	Procesamiento de ARN	1e-17	79.1	KITELGYSCFYI HARMINQQR N	22/22 (100%)
8	Proteína 3 que contiene el dominio FH1/FH2 [Mizuhopecten yessoensis]	OWF39623.1	294,80/39,48	9,34/6,13	Organización del citoesqueleto	0.50	28.6	PPPPP GAP	8/8 (100%)
9	Celulasa [ <i>Haliotis discus hannai</i> ]	BAD01504.1	64,61/41,95	5,95/6,14	Digestión	8e-17	76.1	KQTDMEFFDMI KWPLDYFLK	20/20 (100%)
10	26S proteasa subunidad reguladora 8 (fragmento) [ <i>C. virginica</i> ]	XP_022304231.1	45,72/43,19	7,14/6,56	Degradación proteica	4e-15	77.4	RMLREELQLL QEQGSYGEV VKP	23/23 (100%)
11	Arginina quinasa [ <i>C. gigas</i> ]	EKC24881.1	39,86/43,66	6,40/6,66	Metabolismo energético	9e-16	75.7	RSHASYGFPP VVNAEQCKEM EKI	23/23 (100%)
12	Proteína similar a Kelch 24 [ <i>C. gigas</i> ]	EKC36218.1	63,16/42,88	5,17/6,66	Organización del citoesqueleto	1e-13	72.7	RLASGGTWT EFIGYSFNKK W	22/22 (100%)
13	Proteína iolS [ <i>C. gigas</i> ]	EKC27394.1	28,96/38,59	6,96/6,78	Procesos de oxidación-reducción	2e-12	63.8	KAALSWLVNQ PNVPVAIVGA RT	20/22 (91%)
14	Catepsina B	AGL33709.1	37,80/39,1	6,31/6,87	Apoptosis	7e-12	67.7	KLLLLLVAVG	21/21

CODIGO	PROTEINA	NÚMERO DE ACCESO NCBI	PM (Teo) / (Exp)	PI (Teo) / (Exp)	FUNCIÓN BIOLÓGICA	E-VALUE	SCORE NCBI	SECUENCIA	EMPAQUE- JAMIENTO (%)
	[ <i>Sinonovacula constricta</i> ]		7					MATAYKAPPK <sub>D</sub>	(100%)
15	Biliverdina reductasa A [ <i>C. gigas</i> ]	EKC34745.1	34,43/31,4 7	6,39/6,24	Metabolismo y antioxidante	2e-16	75.3	RDFYNFMEEV TSGKIDQEMK <sub>D</sub>	21/21 (100%)
16	NADH deshidrogenasa subunidad 1 [ <i>Notodoris gardineri</i> ]	YP_00422260 2.1	34,41/27,8 4	6,71/6,50	Cadena respiratoria, Metabolismo energético	5e-14	68.5	KGPNKYSIWGI AQP <sub>LADAVKL</sub>	21/21 (100%)
17	Similar a la isoforma X1 de la proteína 3B que contiene el dominio factor A Von Willebrand [ <i>C. virginica</i> ]	XP_02232790 1.1	222.85/21. 18	9,49/6,18	Organización del citoesqueleto	9e-20	85.9	KLELFDVLGSV AFKHQDGAVD INMKP	26/26 (100%)
18	Similar a la isoforma X1 de la proteína de unión sinaptojanina-2 [ <i>C. virginica</i> ]	XP_02233349 1.1	17.71/ 20.04	4.51/5.97	Vías de señalización	9e-14	68.1	KRVTHNEAVQ HFVNAGEWT LKV	21/22 (95%)
19	Acido farnesoico metiltransferasa [ <i>Ostreia edulis</i> ]	AFJ91732.1	16,91/16,4 2	6,21/6,1	Crecimiento y desarrollo	3e-18	80.8	RDVNNYEVLY LP <sub>SDKDGYYE</sub> WKK	23/23 (100%)
20	Similar a superóxido dismutasa extracelular [Cu-Zn] [ <i>C. virginica</i> ]	XP_02230723 1.1	20,77/16,0 0	5,17/6,41	Antioxidante	1e-16	76.6	RSLAILQGDHT SHTSIACC <sub>CVV</sub> GRS	23/25 (92%)

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*) afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

**Tabla 9.** Lista de proteínas identificadas del grupo de hemolinfa de ostras *Ostrea edulis* de la estirpe EG5 positivo para *Bonamia*-spp. pi: punto isoeléctrico. PM: peso molecular. Teo: Valor teórico. Exp: valor experimental. SCORE: mejor alineamiento entre la longitud de la secuencia obtenida y la secuencia presente en la base de datos NCBI después de la búsqueda BLAST (a mayor score, mejor emparejamiento). E-VALUE: es el número de alineaciones distintas, con una puntuación igual o mejor que el score, que se espera que ocurra por azar en una búsqueda en la base de datos (a menor E-value, mejor emparejamiento). SECUENCIA: únicamente se muestra la secuencia con mejor emparejamiento en la base de datos. Emparejamiento (%): número de aminoácidos de la secuencia proteica que corresponde a los péptidos y porcentaje de coincidentes.

CODIGO	PROTEINA	NUMERO DE ACCESO NCBI	PM (Teo) / (Exp)	pi (Teo) / (Exp)	FUNCIÓN BIOLÓGICA	E-VALUE	SCORE NCBI	SECUENCIA	EMPAREJAMIENTO (%)
21	Proteína P2 ribosomal ácida 60S [ <i>Cryptochiton stelleri</i> ]	O61463.1	11,47/62,8 3	4,35/5,9 1	Elongación proteica	1e-12	60.1	KLASVPSGG GVAAAAPAA GGGGADPA EAKEEKK	33/33 (100%)
22	Proteína con dedo de zinc ZFAT [ <i>C. gigas</i> ]	EKC21126.1	91,12/66,4 5	7,91/6,2 7	Regulación de la transcripción	0.20	29.5	MKHTCKM	7/7 (100%)
23	Proteína homóloga a tiorredoxina 1 [ <i>C. virginica</i> ]	XP_022309459.1	31.95/17,0 8	4.92/5,4 8	Homeostasis redox	0.36	29.1	VKVDKMG	8/8 (100%)



**Tabla 10.** Lista de proteínas identificadas del grupo de hemolinfa de ostras *Ostrea edulis* de la estirpe EGN5 negativo para *Bonamia*- spp. pi: punto isoelectrico. PM: peso molecular. Teo: Valor teórico. Exp: valor experimental. SCORE: mejor alineamiento entre la longitud de la secuencia obtenida y la secuencia presente en la base de datos NCBI después de la búsqueda BLAST (a mayor score, mejor emparejamiento). E-VALUE: es el número de alineaciones distintas, con una puntuación igual o mejor que el Score, que se espera que ocurra por azar en una búsqueda en la base de datos (a menor E-value, mejor emparejamiento). SECUENCIA: únicamente se muestra la secuencia con mejor emparejamiento en la base de datos. Emparejamiento (%): número de aminoácidos de la secuencia proteica que corresponde a los péptidos y porcentaje de coincidentes.

CODIGO	PROTEINA	NUMERO DE ACCESO NCBI	PM (Teo) / (Exp)	pi (Teo) / (Exp)	FUNCIÓN BIOLÓGICA	E-VALUE	SCORE NCBI	SECUENCIA	EMPEAREJAMIENTO (%)
24	Flavoproteína subunidad B del complejo II mitocondrial [ <i>C. gigas</i> ]	EKC34820.1	83,91/78,75	6,28/6,75	Cadena respiratoria, Metabolismo energético	1e-19	85	KYDTSYFIEY FALDLIMEDG ECRG	24/24 (100%)
25	Similar a la proteína 2 del complemento C1q [ <i>C. gigas</i> ]	EKC35881.1	42,90/82,50	5,38/7,06	Sistema inmune	6e-14	68.9	RTMSHNTAS YMTGTNMAV LQLFKG	20-24 (83%)
26	Proteína hipotética CGI_10024713 [ <i>C. gigas</i> ]	EKC32925.1	43,01/76,23	6,03/7,49	Desconocida	4e-22	92.7	KDMDAVLRF LTQPQQPV NIENHEAKL	27/27 (100%)
27	Adenilato quinasa isoenzima 5 [ <i>C. gigas</i> ]	EKC37609.1	99,84/49,33	8,57/5,98	Metabolismo energético	4e-20	86.7	KFEEQJTPK CVLYFDVSD TMTKR	25/25 (100%)

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*) afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

**Tabla 11.** Lista de proteínas identificadas del grupo de hemolinfa de ostras *Ostrea edulis* de la estirpe EGNs positivo para *Bonamia ostreae*. pl: punto isoelectrico. PM: peso molecular. Teo: Valor teórico. Exp: valor experimental. SCORE: mejor alineamiento entre la longitud de la secuencia obtenida y la secuencia presente en la base de datos NCBI después de la búsqueda BLAST (a mayor score, mejor emparejamiento). E-VALUE: es el número de alineaciones distintas, con una puntuación igual o mejor que el Score, que se espera que ocurra por azar en una búsqueda de base de datos (a menor E-value, mejor emparejamiento). SECUENCIA: únicamente se muestra la secuencia con mejor emparejamiento en la base de datos. Emparejamiento (%): número de aminoácidos de la secuencia proteica que corresponde a los péptidos y porcentaje de coincidentes.

CODIGO	PROTEINA	NUMERO DE ACCESO NCBI	PM (Teo) / (Exp)	PI (Teo) / (Exp)	FUNCIÓN BIOLÓGICA	E-VALUE	SCORE NCBI	SECUENCIA	EMPAREJAMIENTO (%)
28	Glutamato sintasa [NADH] amiloplástico [ <i>C. gigas</i> ]	EKC34018.1	244,77/ 44,03	5,76/6,21	Biosíntesis de glutamato	2e-23	96.5	KAFYRWSAFAM EPWDGPALLTF CDGRY	27/27 (100%)
29	Proteína fmtA [ <i>C. gigas</i> ]	EKC28751.1	51,38/45,43	7,69/7,06	Defensa	4e-23	96.1	RLGMTSTSFSTS PAFNPFLQDVAQ GYVKD	29/29 (100%)

**Tabla 12.** Lista de proteínas identificadas del grupo de hemolinfa de ostras *Ostrea edulis* de la estirpe ERS negativo para *Bonamia* spp. pl: punto isoelectrico. PM: peso molecular. Teo: Valor teórico. Exp: valor experimental. SCORE: mejor alineamiento entre la longitud de la secuencia obtenida y la secuencia presente en la base de datos NCBI después de la búsqueda BLAST (a mayor score, mejor emparejamiento). E-VALUE: es el número de alineaciones distintas, con una puntuación igual o mejor que el Score, que se espera que ocurra por azar en una búsqueda en la base de datos (a menor E-value, mejor emparejamiento). SECUENCIA: únicamente se muestra la secuencia con mejor emparejamiento en la base de datos. Emparejamiento (%): número de aminoácidos de la secuencia proteica que corresponde a los péptidos y porcentaje de coincidentes.

CODIGO	PROTEINA	NUMERO DE ACCESO NCBI	PM (Teo) / (Exp)	PI (Teo) / (Exp)	FUNCIÓN BIOLÓGICA	E-VALUE	SCORE NCBI	SECUENCIA	EMPAREJAMIENTO (%)
30	Proteína 1 de unión a GTP reguladora de desarrollo [ <i>C. gigas</i> ]	EKC33015.1	39,12/32,35	8,99/7,30	Crecimiento y diferenciación celular	5e-16	74.0	KWNFDDLLEK MWEYGLVRI	20/20 (100%)

**Tabla 13.** Lista de proteínas identificadas del grupo de hemolinfa de ostras *Ostrea edulis* de la estirpe ERS con señal positiva débil para *Bonamia ostreae*. pl: punto isoelectrico. PM: peso molecular. Teo: Valor teórico. Exp: valor experimental. SCORE: mejor alineamiento entre la longitud de la secuencia obtenida y la secuencia presente en la base de datos NCBI después de la búsqueda BLAST (a mayor score, mejor emparejamiento). E-VALUE: es el número de alineaciones distintas, con una puntuación igual o mejor que el Score, que se espera que ocurra por azar en una búsqueda en la base de datos (a menor E-value, mejor emparejamiento). SECUENCIA: únicamente se muestra la secuencia con mejor emparejamiento en la base de datos.

CODIGO	PROTEINA	NUMERO DE ACCESO NCBI	PM (Teo) / (Exp)	PI (Teo) / (Exp)	FUNCIÓN BIOLÓGICA	E-VALUE	SCORE NCBI	SECUENCIA	EMPAREJAMIENTO (%)
31	Cadena pesada de dineína citoplasmática [ <i>Crassostrea gigas</i> ]	EKC21066.1	561,57/40,11	6,19/6,50	Organización del citoesqueleto	0.04	35	LSCGPMWKWA	9/10 (90%)
32	Proteína 2 asociada a ubiquitina [ <i>C. gigas</i> ]	EKC34321.1	149,10/43,78	6,93/6,61	Degradación proteica	0.024	32.9	SYGSGSSYNS	10/10 (100%)
33	GST omega, parcial [ <i>Reishia clavigera</i> ]	AET43965.1	27,47/44,09	6,09/6,92	Detoxificación	4e-17	77.4	KPAFIDFMW PWERLPSLKK	21/21 (100%)
34	Proteína hipotética LOTGIDRAFT_169702 [ <i>Lottia gigantea</i> ]	XP_009066249.1	59,95/41,52	5,76/7,60	Desconocida	6.3	26.1	VSKKIRTEIP	7/7 (100%)

### 3.4 DISCUSIÓN

Se detectaron diferencias en el perfil proteómico de la hemolinfa entre ostras infectadas con *Bonamia* spp. y ostras no infectadas dentro de cada estirpe. Considerando que las ostras infectadas y no infectadas de la misma estirpe compartieron las mismas condiciones ambientales a lo largo de su vida, las diferencias en el perfil proteómico sugieren que el patrón de expresión proteico cambia debido a la infección por *Bonamia* spp. Los parásitos se han asociado frecuentemente con alteraciones en la variedad y concentración de proteínas en la hemolinfa del hospedador. Previamente ya se había observado una reducción sustancial del número de proteínas en la hemolinfa de *O. edulis* asociado con la infección por *B. ostreae* (Cao *et al.*, 2009). Se han observado niveles de proteína más bajos en *Crassostrea virginica* infectada con *Perkinsus marinus* (Chu *et al.*, 1993) e infectada por *Haplosporidium nelsoni* (Barber *et al.*, 1988). La disminución de los niveles proteicos puede deberse a la rápida utilización de los nutrientes del huésped por el parásito (Cronin *et al.*, 2001). Las estirpes de ostras utilizadas en este estudio mostraron diferentes patrones proteicos entre las ostras positivas y negativas para *Bonamia* spp. en el número de marcas proteicas; este número fue mayor en las ostras negativas para *Bonamia* spp que en las positivas en el caso de EGS, mientras que las ostras EGNS y ESS mostraron el patrón opuesto, con un menor número de marcas proteicas en las ostras negativas para *Bonamia* spp. Por lo tanto, diferentes poblaciones parecen tener diferentes comportamientos para enfrentar la infección por *Bonamia* spp. Las estirpes de *O. edulis* resistentes a bonamiosis expresan más proteínas que las susceptibles (Cao *et al.*, 2009), los resultados obtenidos en las estirpes gallegas (EGS y EGNS) concordaban con esa observación.

El estudio proteómico presentado en este trabajo ha permitido la identificación de proteínas expresadas exclusivamente por cada una de las tres estirpes de ostras (EGS, EGNS y ERS) en diferentes condiciones (infectadas y no infectadas por *Bonamia* spp.). Se identificaron 34 proteínas cuya expresión varía en respuesta a la infección por bonamiosis, por lo que son posibles factores clave en la

interacción parásito-hospedador. Se encontraron discrepancias notables entre los valores teóricos de peso molecular y/o punto isoeléctrico de algunas proteínas identificadas y los valores observados de acuerdo con la posición de sus marcas en los geles. Las isoformas de proteínas generadas por modificaciones postraduccionales, el corte y empalme alternativo o la aparición de familias multigénicas podrían explicar tales discrepancias (De La Fuente et al. 2011).

Las proteínas identificadas muestran que la bonamiosis afecta a las principales vías metabólicas (tales como producción de energía, cadena respiratoria, estrés oxidativo, transducción de señales, transcripción, traducción, degradación proteica y defensa celular). Los cambios en la expresión proteica pueden ser causados por el parásito, que podría bloquear el metabolismo del hospedador con el fin de escapar de los mecanismos de defensa del bivalvo, o reflejar una disfunción metabólica del hospedador como consecuencia de la enfermedad. Una investigación adicional en el proteoma del parásito podría ser realmente interesante para aclarar estas preguntas.

Se identificaron varias proteínas en las estirpes gallegas (EGS and EGNS) negativas para *Bonamia* spp. implicadas en el metabolismo energético. Se sabe que las reservas energéticas del huésped se movilizan para generar la energía necesaria para contrarrestar al parásito (Engelsma *et al.*, 2014). Además, las células inmunitarias requieren un suministro constante de energía para el mantenimiento básico y funciones inmunitarias específicas, tales como migración, fagocitosis y citotoxicidad (Buttgereit *et al.*, 2000; Krauss *et al.*, 2001). La estimulación inmunitaria da como resultado un aumento de la actividad bioquímica y, por tanto, una mayor demanda de ATP. Por lo tanto, procesos cruciales para las funciones inmunes específicas se deterioran rápidamente cuando las células inmunitarias son privadas de energía (Coyne, 2011). Se identificaron proteínas implicadas en el metabolismo energético en ostras de EGS negativas para *Bonamia* spp.: i) **adenilosuccinato sintetasa (AdSS)**, que cataliza la primera reacción en la síntesis de AMP, su regulación se considera un punto de control en el mantenimiento de la relación ATP/GTP en células

(Raman *et al.*, 2004) y ii) **arginina quinasa (AK)**, que cataliza la transferencia de un grupo fosfato entre fosfoarginina y ADP para producir L-Arginina y ATP durante el proceso de respuesta inmune. L-Arginina es la única fuente fisiológica del átomo de nitrógeno para producir óxido nítrico (NO) (Kinsey & Lee, 2003), lo que es crucial en la respuesta inmune innata (Apel & Hirt, 2004). Así, AK podría desempeñar un papel importante en la respuesta inmune contra patógenos invasores modulando la concentración de NO (Shi *et al.*, 2012). En el caso de las ostras EGNS negativas para *Bonamia* spp. se ha identificado la **adenilato quinasa**, que desempeña un papel importante en la provisión de ATP para funciones citoesqueléticas cruciales en los mecanismos de defensa y se reconoce como un marcador sensible del estado energético celular (van HoSRSen *et al.* 2009; Dzeja & Terzic 2009).

También se identificaron componentes clave de la cadena respiratoria en las ostras EGS y EGNS negativas para *Bonamia* spp.: i) **Citocromo C oxidasa**; ii) **NADH deshidrogenasa**, iii) **NADH-ubiquinona oxidorreductasa** y iv) **Succinato deshidrogenasa (SDH)**. La expresión modificada de tales proteínas se había descrito previamente en bivalvos infectados con diferentes parásitos (Tanguy *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2006; Perrigault *et al.*, 2009; Prado-Alvarez *et al.*, 2009a; Fernández-Boo *et al.*, 2016), y en la expresión genética de *O. edulis* infectada por *B. ostreae* (Martín-Gómez *et al.*, 2012). La cadena respiratoria mitocondrial es esencial en la respuesta inmune de los moluscos: i) las células inmunoestimuladas presentan mayores necesidades metabólicas y energéticas (Coyne, 2011; Van Rensburg & Coyne, 2009); ii) un sistema funcional de transporte de electrones es necesario para la fagocitosis de patógenos (Van Rensburg & Coyne, 2009) y iii) la actividad intensiva de la cadena respiratoria genera un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Koopman *et al.*, 2010), considerado un mecanismo de defensa contra patógenos invasores (De Zoysa *et al.*, 2009b). Para sobrevivir a los mecanismos de defensa del huésped, algunos patógenos pueden modular la generación de ROS (Dermine & Desjardins, 1999; Müller, 2004; Schott *et al.*, 2003). Por lo tanto, la interferencia inducida por *B. ostreae* en el estallido



respiratorio de la ostra ayudaría al parásito a sobrevivir y multiplicarse dentro de los hemocitos de *O. edulis* (Comesaña *et al.*, 2012; Hervio *et al.*, 1989; Morga *et al.*, 2011b, 2009). Se ha propuesto que la actividad de una fosfatasa ácida del parásito es responsable del bloqueo del estallido respiratorio (Hervio *et al.*, 1991). Además, nuestros resultados sugieren que la reducción de la producción de ROS en la infección de *Bonamia* spp. podría deberse a una inhibición de la cadena respiratoria, ya que muchas de las proteínas exclusivamente identificadas en poblaciones de ostras no infectadas son componentes de la cadena respiratoria. Tales proteínas no están presentes cuando las ostras están infectadas por *Bonamia* spp. Se sabe que una inhibición del transporte de electrones podría explicar una respuesta inmune reducida y una disminución de la producción de ROS (van Rensburg & Coyne 2009, Donaghy *et al.* 2012). En conjunto, las proteínas implicadas en el metabolismo energético son cruciales en la respuesta inmune y podrían ser bloqueadas por *Bonamia* spp. con el objetivo de obtener una infección exitosa del bivalvo.

Se han identificado proteínas implicadas en síntesis proteica (transcripción y traducción) y en su degradación, lo que demuestra que dichos procesos también se ven afectados en la interacción *Bonamia* spp.- *O. edulis*. Las proteínas **ARN helicasa p47** y la **proteína homóloga a Lupus La**, implicadas en traducción, se identificaron en ostras EGS negativas para *Bonamia* spp. La **proteína dedos de zinc ZFAT** implicada en transcripción, se identificó en la hemolinfa de ostras EGS positivas para *Bonamia* spp. El **factor de iniciación eucariótica 4A-III (eIF4A)** y la **proteína P2 ribosomal ácida 60S**, implicadas en la síntesis de proteínas, se detectaron en ostras EGS negativas y positivas para *Bonamia* spp. respectivamente. Se ha observado que la interacción parásito-huésped inhibe la expresión del eIF4A y, por lo tanto, bloquea la traducción de proteínas (Prasad *et al.*, 2014). La degradación proteica es otro proceso relevante en la homeostasis de las proteínas. La **subunidad reguladora 8 de la proteasa 26S** y la **proteína 2 asociada a la ubiquitina**, implicadas en degradación proteica, se identificaron en ostras EGS negativas para *Bonamia* spp. y en ostras ERS positivas



para *B. ostreae* respectivamente. Se han observado variaciones en la expresión del gen de la subunidad reguladora de la proteasa 26S en las ostras planas parasitadas por *B. ostreae* (Martín-Gómez *et al.*, 2012). Cambios en la expresión de varias proteínas relacionadas con el proteasoma 26S también se observaron en la hemolinfa del pulpo *Octopus vulgaris* infectado con parásitos protozoarios (Castellanos-Martínez *et al.*, 2014b). El proteasoma juega un papel crítico en la degradación de proteínas mediada por ubiquitina a través de la vía ubiquitina-proteasoma y está implicado en la proliferación celular, apoptosis y respuestas al estrés. Por tanto el proteasoma es considerado como un componente esencial del sistema de defensa (H. Wu *et al.*, 2013a).

El citoesqueleto desempeña un papel central en muchas funciones celulares como regulación de la forma celular, división celular, adhesión, motilidad, migración, transducción de señales y fagocitosis, elementos cruciales en los mecanismos de defensa (May & Machesky, 2001). Muchos parásitos son capaces de desafiar la maquinaria celular para invadir y sobrevivir dentro de las células huésped (Rottner *et al.*, 2004). Las interacciones parásito-hospedador están implicadas en cambios citoesqueléticos (Gruenheid & Finlay, 2003). Nuestro análisis ha identificado varias proteínas implicadas en funciones del citoesqueleto: **complejo-T de la proteína 1 $\alpha$** , **proteína 3 que contiene el dominio FH1/FH2**, **proteína similar a Kelch 24** y **proteína 3B que contiene el dominio factor A Von Willebrand (vWFA)**, que fueron identificados en ostras EGS negativas para *Bonamia* spp. La **cadena pesada de dineína citoplasmática** se identificó en las ostras ERS con un positivo débil para *B. ostreae*. Cambios en el citoesqueleto de *O. edulis* después de ser parasitada por *Bonamia* spp. se habían documentado previamente (Chagot *et al.*, 1992; Martín-Gómez *et al.*, 2012; Morga *et al.*, 2011a). La fagocitosis es un proceso dependiente del citoesqueleto (May & Machesky, 2001); variaciones en la expresión de las proteínas del citoesqueleto sugieren que estas proteínas juegan un papel importante en respuesta a *Bonamia* spp., incluso parece que *B. ostreae* contribuye activamente en su propia fagocitosis (Chagot *et al.* 1992).

Tanto la **adenilosuccinato sintetasa** como la **adenilato quinasa**, proteínas mencionadas anteriormente por su implicación en el metabolismo energético, tienen un especial interés ya que participan en la generación de AMP, que tiene un papel clave en diversos procesos inmunológicos de moluscos, especialmente en fagocitosis (Lacoste *et al.*, 2001a; Fabbri & Capuzzo, 2010). La participación de estas dos proteínas en dos procesos independientes (metabolismo energético y fagocitosis) involucrados en la defensa frente a parásitos pone de manifiesto su importancia en la respuesta a la bonamiosis. La modulación de estas proteínas relacionadas con el metabolismo energético se ha observado previamente en diferentes procesos patológicos (G. Chen *et al.*, 2011; H. Wu *et al.*, 2013a).

Otro proceso celular relevante para el que se identificaron proteínas específicas es la defensa celular. En particular, identificamos las proteínas implicadas en i) activación del sistema del complemento, ii) apoptosis y iii) control redox.

C1q es el primer subcomponente del complejo C1 de la vía clásica de activación del complemento, que es crucial para la eliminación de patógenos en invertebrados (Zhang *et al.*, 2008). Proteínas relacionadas con C1 son una de las principales clases de PRRs (receptores de reconocimiento de patrones) en la mayoría de bivalvos (Gerdol *et al.*, 2015), y están fuertemente implicados en la respuesta inmune de los bivalvos (Zhang *et al.*, 2008; L. Zhang *et al.*, 2014). La **proteína 2 del complemento C1q** se identificó en ostras ENGS negativas para *Bonamia* spp. La implicación de esta proteína en la interacción hospedador-parásito se ha documentado en otros bivalvos como *Ruditapes decussatus* infectada por *Perkinsus olseni* (Prado-Alvarez *et al.*, 2009a) y *Mercenaria mercenaria* parasitada por QPX (Perrigault *et al.*, 2009). En las ostras europeas planas, la expresión de C1q cambia significativamente como consecuencia de patologías como bonamiosis y neoplasia (Martín-Gómez *et al.*, 2014b). C1q se ha propuesto como uno de los genes que confieren resistencia a enfermedades parasitarias en las ostras, como es el caso de *Saccostrea glomerata* frente a *Marteilia sydneyi* y *O. edulis* frente a *B. ostreae* (Green *et al.*, 2009; Morga *et al.*, 2012).

La apoptosis juega un papel clave en la defensa contra parásitos protozoarios y otros patógenos. Los mecanismos y vías de señalización que subyacen a la apoptosis son cruciales en la defensa inmune de moluscos (Schaumburg *et al.*, 2006; Sokolova, 2009). En bivalvos, la apoptosis juega un papel importante en la respuesta frente a parásitos, como es el caso de ostras *C. virginica* contra *P. marinus* (Hughes *et al.*, 2010) y de almejas *R. decussatus* contra *P. olseni* (Prado-Alvarez *et al.*, 2009a). Un gran número de genes implicados en apoptosis se han identificado recientemente en *C. gigas* cuya expresión se sobreexpresa por la infección de *Vibrio anguillarum* (L. Zhang *et al.*, 2011b). En nuestro estudio se identificaron dos proteínas implicadas en la apoptosis presentes sólo en la hemolinfa de ostras EGS negativas para *Bonamia* spp.: la **proteína homóloga a Lupus La** y la **catepsina B**. La proteína Lupus La participa en la síntesis proteica, modulando estabilidad y/o la traducción de otras proteínas asociadas con la apoptosis (Valavanis *et al.*, 2007). Las catepsinas participan en apoptosis y tienen un papel fundamental en la respuesta inmune de bivalvos, estando implicadas en la interacción entre almejas y parásitos *Perkinsus* spp. (Kang *et al.*, 2006; Soudant *et al.*, 2013) y en zamburiñas chinas *Chlamys farreri* (Wang *et al.*, 2009b). Se ha observado que el gen de la catepsina B se sobreexpresa en la interacción *O. edulis* - *Bonamia* spp. (Morga *et al.*, 2012). La manipulación de procesos apoptóticos del hospedador por parásitos intracelulares ocurre tanto en vertebrados como en invertebrados (Deveraux *et al.*, 1997; Schaumburg *et al.*, 2006). Por lo tanto, *B. ostreae* podría inhibir la apoptosis para sobrevivir dentro de los hemocitos de ostras, como se ha sugerido previamente (Gervais *et al.*, 2016; Morga *et al.*, 2012, 2017).

El balance redox es un proceso importante para la defensa celular. En nuestro estudio se identificaron varias proteínas que participan en la respuesta al estrés oxidativo de la célula. En concreto, la **biliverdina reductasa A (BVRA)** y la **superóxido dismutasa extracelular [Cu-Zn] (EcSOD)** en ostras seleccionadas EGS negativas para *Bonamia* spp., mientras que la **tioredoxina 1** y la **glutación S-transferasa omega (GST $\Omega$ )**, también implicadas en la respuesta al estrés oxidativo (Lillig & Holmgren, 2007; Martins *et al.*,

2014), se detectaron en ostras seleccionadas EGS positivas para *Bonamia* spp. y *B. ostreae*, respectivamente. El producto de la enzima BVRA, la bilirrubina, se ha descrito como un potente limpiador de ROS con efecto citoprotector (Kapitulnik & Maines, 2009). Se sabe que SOD está implicada en la respuesta al estrés oxidativo (Gonzalez *et al.*, 2005), siendo uno de los mecanismos más importantes de defensa antioxidante en casi todas las células, incluyendo las de moluscos (Anju *et al.*, 2013a). Varios estudios muestran la implicación de la SOD en la respuesta inmune de bivalvos, entre otros en la interacción parásito-hospedador; la expresión de EcSOD en ostras resistentes *S. glomerata* al parásito *M. sydneyi* es mucho mayor que en las no resistentes (Green *et al.*, 2009). La expresión de SOD varía en los hemocitos de *O. edulis* enfrentados a *B. ostreae in vitro e in vivo* (Morga *et al.* 2011b, 2017). Además de su papel antioxidante, la SOD es responsable de producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un segundo mensajero importante que tiene potencial para causar daño oxidativo en parásitos, activar la transcripción de genes y vías de transducción de señales e influir en la activación celular (Goodall *et al.*, 2004; Reth, 2002). Por tanto, niveles altos de actividad de Cu/Zn SOD pueden dar lugar a un estallido respiratorio más potente y letal (Goodall *et al.*, 2004). Por lo tanto, la inhibición del estallido respiratorio inducida por *Bonamia* spp ayudaría al parásito a sobrevivir y dividirse dentro de los hemocitos de *O. edulis* (Hervio *et al.* 1991, Morga *et al.* 2009, 2011b, 2017, Comesaña *et al.* 2012).

Se ha identificado el gen de la tiorredoxina implicado en la respuesta inmune de *O. edulis* a la bonamiosis (Martín-Gómez *et al.*, 2012). Dicha proteína podría ser producida por el protozoo para protegerse de la defensa del bivalvo; en el parásito *P. marinus* se observó un aumento de la expresión de la tiorredoxina tras su exposición al mucus de *C. virginica* (Pales Espinosa *et al.*, 2014). GST juega un papel importante en la defensa de bivalvos contra parásitos; en *R. philippinarum* el gen GST se expresa en almejas infectadas por *P. olseni* (Kang *et al.*, 2006) y en ostras *C. virginica* parasitadas por *P. marinus* (Tanguy *et al.*, 2004). El aumento de la expresión de GST $\Omega$  se ha documentado previamente durante la

Comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras (*Ostrea edulis*)  
afectadas por bonamiosis y ostras no afectadas

interacción de *O. edulis* - *B. ostreae* (Martín-Gómez *et al.*, 2012; Morga *et al.*, 2011b).

Se realizó un estudio adicional comparando el perfil proteómico de la hemolinfa entre las ostras negativas para *Bonamia* spp. de las dos estirpes gallegas. Considerando que las ostras utilizadas en el estudio de ambas poblaciones gallegas compartieron las mismas condiciones ambientales durante toda su vida, las diferencias en el perfil proteico entre ambas estirpes deberían asociarse con diferencias de genotipo. Algunas de las variaciones basadas en el genotipo en la expresión de proteínas podrían ser la base de la mayor resistencia a la bonamiosis de las ostras EGS en comparación con las EGNS. Las ostras de ambas estirpes gallegas crecieron en un área de la ría de Arousa afectada por bonamiosis y, como se esperaba, el número de ostras positivas *Bonamia* spp. en el diagnóstico mediante PCR fue mayor en la estirpe no seleccionada (ver la sección de Materiales y Métodos).

Se identificaron 7 proteínas exclusivas de la hemolinfa de ostras EGS al compararlas con ostras EGNS negativas para *Bonamia* spp.; se trata de las marcas proteicas 1, 3, 5, 10, 12, 14 y 17, que corresponden con las proteínas: citocromo C oxidasa subunidad I, adenilosuccinato sintetasa, factor de iniciación eucariótico 4A-III, 26S proteasa subunidad reguladora 8, proteína similar a Kelch 24, catépsina B, y proteína 3B que contiene el dominio factor A von Willebrand. Dichas proteínas parecen jugar un papel relevante en la interacción con *Bonamia* spp. Es importante destacar que algunos de ellos (catépsina B, proteína similar a Kelch 24 y vWFA) están involucradas en procesos de apoptosis y fagocitosis, que se han destacado previamente como mecanismos clave que apoyan la resistencia a la bonamiosis en *O. edulis* (Morga *et al.*, 2017). Sorprendentemente, dentro de las 7 proteínas únicas de la hemolinfa de ostras EGS al compararlas con ostras EGNS hay proteínas que se han observado expresadas de manera diferencial en moluscos seleccionados para resistencia a enfermedades (en comparación con las poblaciones no seleccionadas) es el caso de: citocromo c oxidasa (Lockyer *et al.*, 2012, 2008), eIF4A (Hong *et al.*, 2011), vWFA (Bouchut *et al.* 2006a,

McDowell *et al.* 2014), y catepsina B (Lockyer *et al.* 2008, Fleury & Huvet 2012, Morga *et al.* 2012, Zahoor *et al.* 2014). Por tanto, las proteínas candidatas a ser marcadores de resistencia frente a bonamiosis, de confirmarse, podrían usarse en programas de reproducción selectiva asistida por marcadores para producir cepas de ostra resistentes a la bonamiosis.

La identificación de 34 proteínas cuya presencia en la hemolinfa de ostras está modulada por *Bonamia* spp. contribuye a entender la interacción hospedador-parásito en el contexto de la bonamiosis de ostra. Además, las proteínas candidatas a ser marcadores de resistencia, de confirmarse, podrían usarse en programas de reproducción selectiva asistida por marcadores para producir cepas de ostra resistentes a la bonamiosis.





# **4 ESTUDIO PROTEÓMICO DE GRANULOCITOS E HALINOCITOS DE *Ostrea edulis* MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL**

## **4.1 INTRODUCCIÓN**

### **4.1.1 Tipos hemocitarios de *Ostrea edulis***

Como se explica en la introducción general de esta tesis, la homeostasis de bivalvos recae en gran parte en los hemocitos, células encargadas de varias funciones fisiológicas (Donaghy *et al.*, 2009a), que incluyen digestión, transporte y distribución de nutrientes (Beninger *et al.*, 2003; Cheng, 1996), reparación de concha y tejidos blandos (Mount *et al.*, 2004), procesos de detoxificación, excreción (Fisher, 2004; Matozzo *et al.*, 2001) y respuesta inmune (Canesi *et al.*, 2002b; Cheng, 2000; Chu, 2000).

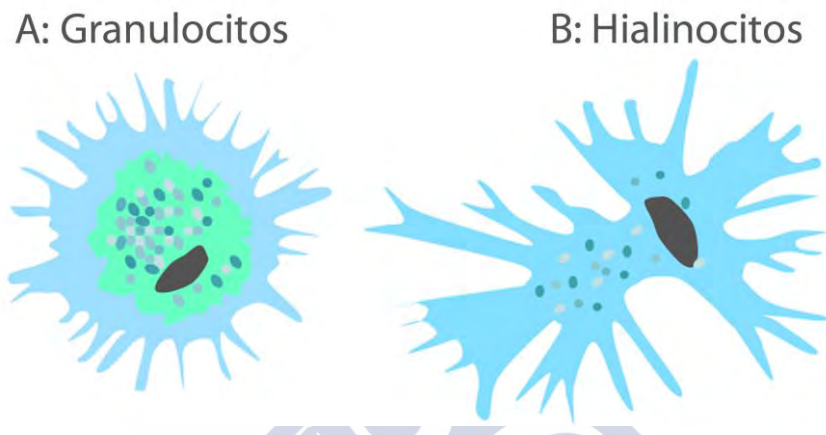
Factores ambientales, incluyendo temperatura, salinidad, nutrientes y sustancias tóxicas afectan a la homeostasis de moluscos marinos. Los hemocitos son sensibles a variaciones de dichos factores, variando el estado fisiológico de los bivalvos y realizando la buena adaptación de estos organismos al medio ambiente (Chu, 2000; Donaghy *et al.*, 2009a). Dentro de todas sus funciones, destaca el papel de los hemocitos en la respuesta inmune frente a agentes patógenos (Auffret, 1988; Bayne *et al.*, 1980; Cajaraville & Pal, 1995;



Canesi *et al.*, 2002b; Chu, 2000). Muchos factores antimicrobianos (péptidos antimicrobianos, enzimas lisosomales, lectinas) son sintetizados en los hemocitos (Mitta *et al.*, 2000d, 1999b; Mohandas *et al.*, 1985; Tunkijjanukij & Olafsen, 1998). Dichos factores están involucrados en la destrucción de microorganismos en el interior celular y son liberados al plasma para una respuesta antimicrobiana sistémica (Cheng, 1986; Cheng *et al.*, 1975; Mitta *et al.*, 1999b). Al estudiar la actividad antibacteriana existente en hemocitos y en plasma se encontró mayor actividad en hemocitos (Anderson & Beaven, 2001; Haug *et al.*, 2004), realizando la importancia de estas células en el sistema inmune de los bivalvos. Sin embargo, los hemocitos de algunas especies de bivalvos también pueden servir como hospedadores de ciertos patógenos intracelulares o como vector de diferentes parásitos (Grizel *et al.*, 1988; Harris-Young *et al.*, 1995; Hine & Thorne, 1997; Hine & Wesney, 1994b). Estudios previos indican que los hemocitos juegan un papel importante en la resistencia/susceptibilidad a enfermedades de ostras (Bezemer *et al.*, 2006; Fernández-Boo *et al.*, 2016; Newton *et al.*, 2004; Peters & Raftos, 2003).

Los hemocitos presentan gran diversidad morfológica (Anderson, 1981); numerosos autores han centrado sus esfuerzos en el desarrollo de una clasificación de los distintos tipos hemocitarios presentes en moluscos bivalvos. Desde los años 70, se han utilizado varios criterios de clasificación, principalmente basados en aspectos de morfología celular y citoquímica enzimática. Actualmente las técnicas más recientes de identificación de tipos hemocitarios se centran en microscopía y citometría de flujo, herramientas que permiten determinar el tamaño y la granularidad de los hemocitos. Los investigadores Cheng (1981) y Hine (1999) publicaron dos de las revisiones más importantes sobre aspectos morfofuncionales de hemocitos del Filo Mollusca, aunque las mayores diferencias morfológicas de los hemocitos (tamaño y complejidad) se han observado mediante citometría de flujo (Soudant *et al.*, 2008). Estos estudios han permitido clasificar los hemocitos de bivalvos en granulocitos, células con gránulos en el citoplasma, e hialinocitos (o agranulocitos), células con un citoplasma claro y prácticamente

carente de gránulos (Auffret, 1988; Cheng, 1981; Fisher, 1986) (Figura 1). Estos gránulos son una parte esencial de inmunomodulación de los hemocitos por contener enzimas defensivas y componentes antimicrobianos (Kuchel *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Imágenes esquemáticas de los distintos tipos hemocitarios de *Ostrea edulis*: Granulocitos (A) y Hialinocitos (B) (Imagen adaptada de Soudant *et al.* 2008).

Estos dos tipos hemocitarios se han identificados en diversos bivalvos como almejas (*Mya arenaria* (Huffman & Tripp, 1982), *Mercenaria mercenaria* (Moore & Eble, 1977), *Ruditapes philippinarum* (Cima *et al.*, 2000; Oubella *et al.*, 1996), *Ruditapes decussatus* (López *et al.*, 1997b), *Meretrix lusoria* (Chang *et al.*, 2005), *Corbicula japonica* (Anisimova *et al.*, 2017), *Callista chione* (Matozzo & Bailo, 2015)), vieiras (*Chlamys farreri* (Jing & Wenbin, 2005), *Nodipecten subnodosus* (Estrada *et al.*, 2013)), berberechos (*Cerastoderma edule* (Russell-Pinto *et al.*, 1994)), mejillones (*Mytilus edulis* (Pipe, 1990), *Mytilus galloprovincialis* (Carballal *et al.*, 1997), *Perna perna* (Barracco *et al.*, 1999), *Pinna nobilis* (Matozzo *et al.*, 2016), *Mytilus coruscus* (Yang *et al.*, 2015), *Dreissena polymorpha* (Evariste *et al.*, 2016), *Anodonta cygnea*, *Anodonta anatina*

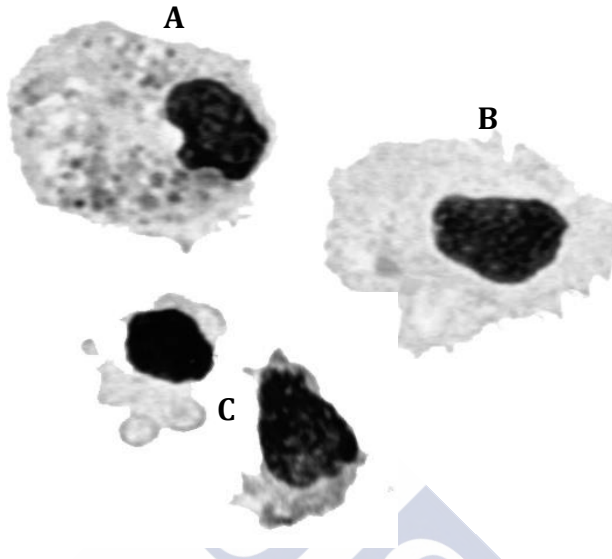
(Hinzmann *et al.*, 2017)) y ostras (*Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* (Auffret, 1989), *Crassostrea virginica* (Wikfors & Alix, 2014), *Crassostrea rhizophorae* (Barth *et al.*, 2005), *Crassostrea ariakensis* (Donaghy *et al.*, 2009b), *Crassostrea nippona* (Hong *et al.*, 2014), *Crassostrea plicatula* (Lin *et al.*, 2014), *Pteria hirundo* (Vieira *et al.*, 2017), *Saccostrea kegaki*, *Ostrea circumpicta*, *Hyotissa hyotis* (Hong *et al.*, 2013)).

Se han propuesto diversas teorías para dilucidar el linaje de los hemocitos. Cheng 1981 y Auffret 1988 proponen dos tipos de precursores iniciales de células capaces de diferenciarse en granulocitos e hialinocitos. Años después, se sugirió un modelo con un único tipo celular precursor que da lugar a hialinocitos que maduran más tarde en granulocitos (Hine, 1999). Una única población de células precursoras carentes de gránulos en su citoplasma se ha descrito en *R. philippinarum* (Cima *et al.*, 2000; Matozzo *et al.*, 2008) apoyando la hipótesis presentada por Hine. A diferencia de los granulocitos e hialinocitos, las células precursoras no contribuyen a los mecanismos de respuesta inmune como fagocitosis o encapsulación, además carecen de sistemas enzimáticos intracelulares comunes asociados con la defensa del huésped. La presencia de pocos orgánulos citoplasmáticos y de una baja actividad enzimática sugiere que estas células precursoras son hemocitos inmaduros (Cima *et al.*, 2000; Hine, 1999) dejando abierta la posibilidad de que dichas células actúen como células madre a partir de las cuales se derivan las dos clases de hemocitos maduros. En muchos invertebrados, múltiples tipos de hemocitos parecen derivar de la diferenciación de células madre que tienen una morfología muy similar a las células presentes en *S. glomerata* considerados hemocitos precursores (Johansson *et al.*, 2000; Meister, 2004). En la almeja *Ruditapes philippinarum*, los precursores de hemocitos se reconocen por los anticuerpos anti-CD34 (Cima *et al.*, 2000). CD34 es una glicoproteína transmembrana que actúa como un marcador de superficie de células madre hematopoyéticas muy tempranas en mamíferos (Satterthwaite *et al.*, 1992). Su expresión en células de invertebrados sugiere que pueden tener un papel similar. Precursores de hemocitos se han encontrado ampliamente en *Crassostrea rhizophorae* (Rebelo *et al.*, 2013), *S.*

*glomerata* (Aladaileh *et al.*, 2007b), *Lamellidens marginalis* (Ray *et al.*, 2013), *R. decussatus* y *R. philippinarum* (Donaghy *et al.*, 2009a). Rebelo *et al.* 2013 proponen otra hipótesis en la que los distintos tipos hemocitarios derivan del mismo tipo celular que va madurando primero sin gránulos (hialinocito), más tarde produce gránulos (granulocito) y finalmente, de manera eventual, pueden perder los gránulos siendo de nuevo una célula agranular. Este estudio se basa en observaciones realizadas en *Crassostrea rhizophorae* y más tarde en *C. virginica* (Wikfors & Alix, 2014).

A pesar de las diversas teorías, el estudio detallado de la hematopoyesis larval y adulta en bivalvos sólo será posible mediante secuenciación de genomas de moluscos e identificación del conjunto completo de factores de transcripción y biomarcadores que regulan la hematopoyesis (Bassim *et al.*, 2014; Dyachuk, 2016; Pila *et al.*, 2016). No existe un órgano hematopoyético ni un precursor celular claro aunque la creencia generalmente aceptada es que los hemocitos pueden originarse a partir de células del tejido conjuntivo (Cheng, 1981). Recientemente, se ha propuesto que los hemocitos pueden diferenciarse de una población de células somáticas adultas que residen en una estructura irregularmente plegada en la branquia de la ostra adulta en *C. gigas* (Jemaà *et al.*, 2014).

En el caso de la ostra plana europea, *O. edulis*, los tipos hemocitarios se dividen en tres categorías: Granulocitos (hemocitos de un diámetro aproximado de 10  $\mu$ m y gránulos citoplasmáticos), Hialinocitos grandes (hemocitos con un diámetro alrededor de 15  $\mu$ m y sin gránulos) e Hialinocitos pequeños (hemocitos agranulares con un diámetro entre 5  $\mu$ m y 10  $\mu$ m) (Auffret, 1989; Bachère *et al.*, 1991; Chagot *et al.*, 1992; Cochenec-Laureau *et al.*, 2003a; Xue *et al.*, 2001) (Figura 2).



**Figura 2.** Imágenes de los distintos tipos hemocitarios de *Ostrea edulis*: Granulocitos, con gránulos citoplasmáticos (A), Hialinocitos grandes (B) e Hialinocitos pequeños(C).

La abundancia relativa de cada tipo celular en la hemolinfa de moluscos bivalvos es variable y está influenciada por la presencia de ciertos patógenos (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a). Generalmente se considera que los granulocitos son el tipo celular más abundante (Allam *et al.*, 2001), hecho que también se observó en *O. edulis* (da Silva *et al.*, 2008b); aunque esto no ocurre en todas las especies; por ejemplo, hay estudios que afirman que los pectínidos presentan hialinocitos como único tipo celular (Vásquez-Yeomans & Cáceres-Martínez, 2007), lo que no concuerda con otros estudios realizados en vieiras (Estrada *et al.*, 2013; Jing & Wenbin, 2005).

#### **4.1.2 Diferencias funcionales entre hialiocitos y granulocitos**

Aunque la distinción entre hialinocitos y granulocitos se realizó inicialmente en base a parámetros morfológicos, se ha confirmado que también existen diferencias entre ambos tipos hemocitarios tras un

análisis de parámetros metabólicos y funcionales (Donaghy & Volety, 2011; Parisi *et al.*, 2008).

Se han encontrado diferencias en la locomoción entre los tipos celulares de ostras *Pinctada imbricata*, mientras que los granulocitos tienen un movimiento ameboidal y direccional, los hialinocitos a menudo se adhieren a un sustrato y se propagan multidireccionalmente (Kuchel *et al.*, 2010).

Ya hace años se encontraron diferencias en la susceptibilidad de *C. virginica* al protozoo *Haplosporidium nelsoni* (MSX), observando que existía un menor porcentaje de granulocitos en las ostras más susceptibles (Ford *et al.*, 1993). Del mismo modo, Allam *et al.* (2001) encontraron que la susceptibilidad a la enfermedad del anillo marrón en almejas, causada por *Vibrio tapetis*, estaba relacionada con la cantidad de hemocitos granulares, los individuos más resistentes presentaban mayor porcentaje de dichas células en su hemolinfa, resultando en una mayor actividad fagocítica. Las poblaciones de la ostra europea *O. edulis* con mayor resistencia a la infección por *B. ostreae* también han demostrado tener diferentes hemogramas a los de las poblaciones susceptibles (Culloty *et al.*, 2004; Naciri-Graven *et al.*, 1998). Estos datos sugieren que la resistencia a infecciones por microorganismos está vinculado al aumento de granulocitos, células con mayores tasas de eliminación fagocítica que otros hemocitos.

Uno de los mecanismos celulares más importantes de la respuesta inmune de bivalvos marinos mediado por hemocitos es la internalización de material antigénico (Canesi *et al.*, 2002b). El reconocimiento y la unión a materiales no propios por receptores expresados en la superficie de los hemocitos induce el mecanismo de internalización llamado fagocitosis. Cuando no es posible llevar a cabo este proceso, los microorganismos son rodeados y degradados extracelularmente mediante encapsulación (Cheng, 1981; Donaghy *et al.*, 2009a) (Figura 3). En dichos procesos relevantes en la defensa del organismo, se han encontrado diferencias entre los tipos hemocitarios. Los granulocitos se consideran el tipo celular con mayor actividad fagocítica (Kuchel *et al.*, 2010), llegándose a considerarlos como el



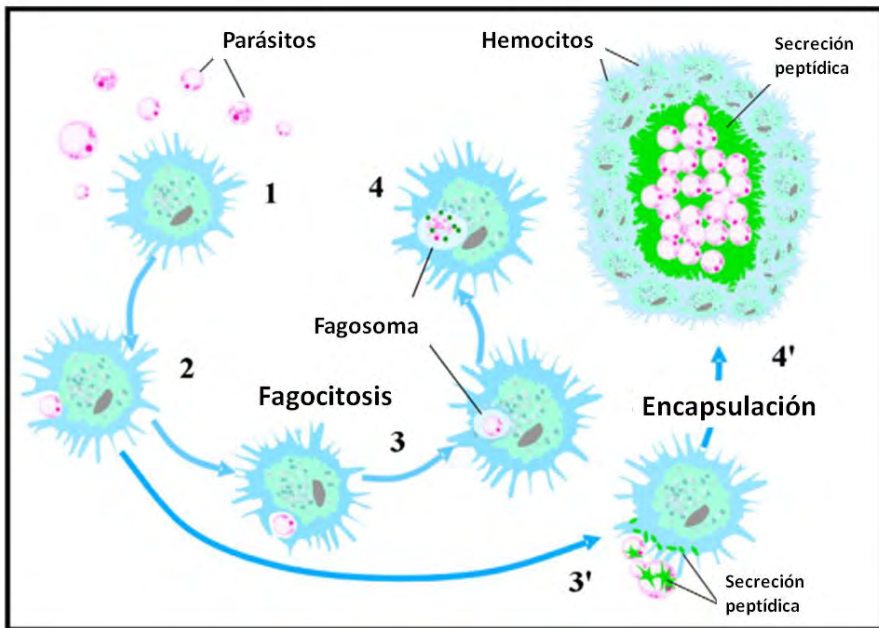
único tipo hemocitario capaz de fagocitar (Wikfors & Alix, 2014). Otros estudios han demostrado que ciertos tipos celulares preferentemente fagocitan diferentes células diana. Así, los granulocitos en *C. gigas* engullen más levaduras y bacterias que los hialinocitos, mientras que los hialinocitos fagocitan más perlas de látex (Terahara *et al.*, 2006). Los granulocitos son también el tipo celular predominante implicado en reacciones de encapsulación en ostras *Saccostrea glomerata* (Aladaileh *et al.*, 2007b).

Es comúnmente asumida la hipótesis de que los granulocitos son el principal tipo hemocitario implicado en la defensa inmune de bivalvos (Carballal *et al.*, 1997c; Donaghy & Volety, 2011; Hégaret *et al.*, 2003; Terahara *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2017). Uno de los motivos es que los granulocitos parecen poseer mayor capacidad fagocítica que los hialinocitos (Cajaraville & Pal, 1995; Fisher, 1988; López *et al.*, 1997c; Chu, 2000; Hong *et al.*, 2013), al presentar mayor cantidad de enzimas lisosomales (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a; López *et al.*, 1997a; Pipe *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2017). Los lisosomas de organismos marinos juegan un papel importante en detoxificación y en reacciones defensivas, contribuyendo a la degradación de patógenos intracitoplasmáticamente y en la liberación de enzimas lisosomales que participan en la destrucción de microorganismos en el medio extracelular (Cheng, 1981; Montes *et al.*, 1995). En diversos estudios se han encontrado gran cantidad de lisosomas en granulocitos y pocos en hialinocitos, especialmente en los hialinocitos pequeños (Carballal *et al.*, 1997c; López *et al.*, 1997a; Cheng, 1981; Donaghy & Volety, 2011; Hong *et al.*, 2013). Se ha observado que *B. ostreae* se multiplica con mayor éxito en el interior de hialinocitos que de granulocitos (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a). Las diferentes cantidades de lisosomas entre tipos de hemocitos podrían estar relacionados con diferentes funciones celulares (Hong *et al.*, 2013). Se ha observado que la distribución de enzimas hidrolíticas entre granulocitos e hialinocitos en la almeja japonesa da lugar a diferentes respuestas fisiológicas e inmunológicas (Cima *et al.*, 2000). Actividades enzimáticas intracelulares están asociadas con la capacidad de los hemocitos de eliminar patógenos tras la fagocitosis, se ha demostrado que los granulocitos de bivalvos



contienen altos niveles de actividad enzimática ácido fosfatasa y fenoloxidasa y la habilidad de formar superóxidos y peróxidos (Aladaileh *et al.*, 2007b). La presencia de la ácido fosfatasa indica que algunos gránulos pueden funcionar como lisosomas, participando en la digestión intracelular de proteínas, carbohidratos y lípidos como una parte del sistema fagosomal, lo que sugiere que los granulocitos tienen mayor capacidad para eliminar patógenos tras la fagocitosis.

Por su parte el índice fagocítico de hialinocitos parece estar relacionado con la naturaleza de la materia extraña, lo que sugiere diferencias funcionales entre tipos hemocitarios y una fagocitosis basada en receptores de iniciación (López *et al.*, 1997a). La caracterización de una  $\zeta$ -integrina en hemocitos de *C. gigas* implicada en procesos de apoptosis y adhesión hemocitaria mostró además que



**Figura 3.** Representación esquemática de los posibles mecanismos de defensa celular en bivalvos frente a microorganismos y parásitos. El proceso de fagocitosis se puede dividir en: (1) Quimiotaxis, atracción y migración hacia el cuerpo extraño (2) Reconocimiento y anclaje del agente extraño; (3) Internalización; y (4) Degradación intracelular. Los microorganismos también pueden ser encapsulados y degradados extracelularmente (3' y 4') (Imagen adaptada de Soudant *et al.* 2008).

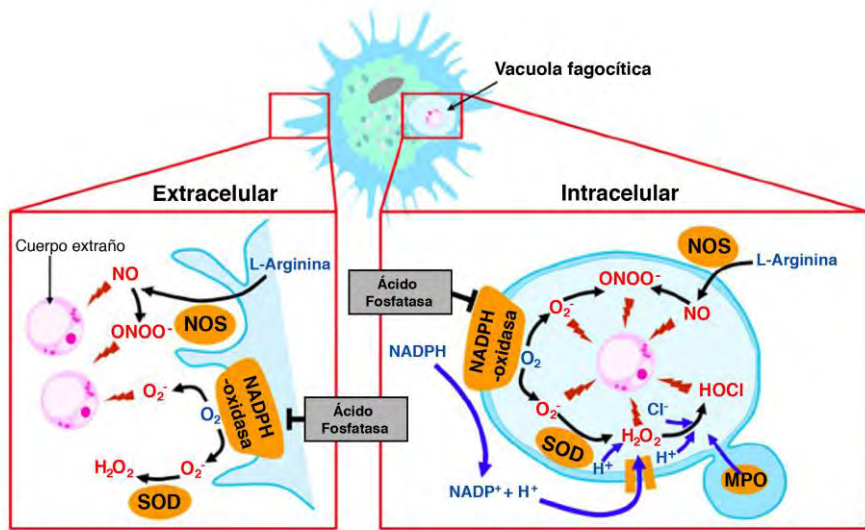
la fagocitosis en los hialinocitos de la ostra está regulada por un mecanismo dependiente de integrinas y que los granulocitos podrían poseer otros receptores para llevar a cabo este papel (Terahara *et al.*, 2006). Otros autores creen que las diferencias en la capacidad fagocítica entre tipos hemocitarios puede estar relacionada con la naturaleza de las partículas fagocitadas (Evariste *et al.*, 2016; Hine, 1999).

Mientras que los granulocitos son las células fagocíticas principales, se cree que los hialinocitos están más especializados en agregación y reparación de heridas (Ruddell, 1971; Suzuki *et al.*, 1991). Estudios realizados en almejas y ostras muestran un papel central de los hialinocitos en los procesos de agregación hemocitaria; en *Tridacna crocea* se han encontrado hialinocitos en el núcleo de las agregaciones de hemocitos asociados con la cicatrización de heridas (Aladaileh *et al.*, 2007b; Nakayama *et al.*, 1997).

Unido al proceso de fagocitosis se encuentra el "estallido respiratorio", un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que actúan como potentes efectores inmunológicos y tienen como objetivo la degradación de microorganismos invasores (Bachère *et al.*, 1991; Comesaña *et al.*, 2012) (Figura 4). Los ROS muestran un amplio espectro de toxicidad y son cruciales en la defensa del hospedador y en el buen funcionamiento de los hemocitos. Particularmente el radical hidróxido (OH<sup>•</sup>) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) poseen mayor capacidad de desnaturalización proteica (Tiscar & Mosca, 2004). La actividad oxidativa a través de la producción de ROS es más elevada en granulocitos que en hialinocitos (Donaghy *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2013; Lambert *et al.*, 2007, 2003; Wang *et al.*, 2017); incluso se cree que ambos hemocitos son capaces de producir ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) distintos (Hong *et al.*, 2013). Normalmente, los granulocitos muestran niveles más altos de apoptosis que los hialinocitos, posiblemente debido a una mayor actividad fagocítica y estallido respiratorio (Goedken *et al.*, 2005; Sunila & LaBanca, 2003). Además, estudios previos indican que los hemocitos juegan un papel importante en la resistencia/susceptibilidad a enfermedades de ostras (Bezemer *et al.*, 2006; Newton *et al.*, 2004;

Peters & Raftos, 2003). Incluso hay estudios donde se ha demostrado que las subpoblaciones hemocitarias son capaces de discriminar entre distintas especies de patógenos (H. Li *et al.*, 2008).

Los granulocitos de moluscos poseen una fuerte similitud con los



**Figura 4.** Vías metabólicas implicadas en la producción de las principales especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), en el exterior de la membrana celular (izquierda) y en el interior del fagosoma (derecha) en hemocitos de bivalvos. (NO: Óxido nítrico; ONOO<sup>-</sup>: Peroxinitrito; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Anión superóxido; HOCl: Hipoclorito; NOS: óxido nítrico sintasa; SOD: Superóxido dismutasa; EC-SOD: Superóxido dismutasa extracelular; MPO: mieloperoxidasa) (Imagen adaptada de Soudant *et al.* 2008).

monocitos y macrófagos de vertebrados tanto en la estructura como en la función y comparten con éstos últimos propiedades clave como la fagocitosis, estallido respiratorio inducido por patógenos, producción y liberación de óxido nítrico y enzimas lisosomales (Canesi *et al.*, 2002b). Por tanto, se considera que los granulocitos son más eficientes en la eliminación de microorganismos que los hialinocitos.

### 4.1.3 Objetivos

Con la intención de profundizar en las diferencias funcionales entre los dos tipos fundamentales de hemocitos de *O. edulis*, granulocitos e hialinocitos, se abordó la comparación entre los proteomas respectivos, utilizando un procedimiento de separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional, seguido por la comparación de los patrones de manchas proteicas correspondientes a cada tipo hemocitario para identificar manchas exclusivas de cada tipo celular, culminando el proceso con la identificación de las proteínas correspondientes a dichas manchas proteicas exclusivas de granulocitos e hialinocitos, mediante espectrometría de masas.

## 4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.2.1 Material biológico

Para realizar los experimentos de separación hemocitaria se utilizaron 100 ostras "naive", es decir, ostras que no han estado en contacto con *Bonamia* spp., procedentes de Dinamarca, para evitar posibles interferencias que pudiera causar la infección por *Bonamia* spp. Los bivalvos vivos se transportaron a las instalaciones del CIMA y se mantuvieron en tanques de 30L, con agua bombeada de la Ría de Arousa (circuito abierto) hasta el momento de su utilización.

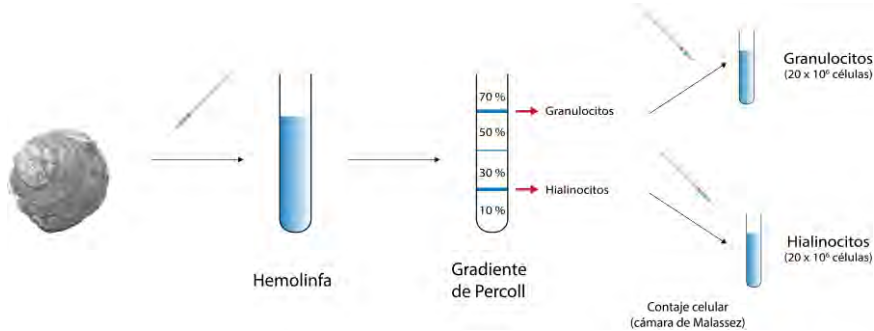
### 4.2.2 Obtención de muestras de hemolinfa

La hemolinfa se obtuvo por extracción directa del músculo aductor con agujas de calibre 21 (3G) (40 x 0,8 mm) acopladas a jeringuillas de 1 ml de volumen que contenían 0,5 mL de Solución de Alsever Modificada (MAS) (2,08% (p/v) glucosa; 0,8% (p/v) citrato sódico; 0,34% (p/v) EDTA; 2,25% (p/v) cloruro de sodio; 7,5 pH; 1000 mOsm estéril y con una filtración 0.22  $\mu$ m), que evita la agregación celular, facilitando así, la posterior separación hemocitaria (Bachère *et al.*, 1988). Para poder acceder al músculo aductor, las valvas se separaron ligeramente con un cuchillo de abrir ostras y se introdujo una punta desechable de pipeta, a modo de cuña, para

mantener las valvas lo suficientemente separadas como para permitir la introducción de la aguja hasta el músculo aductor. Las muestras de hemolinfa obtenidas se observaron bajo microscopio óptico para asegurar que toda la hemolinfa extraída estuviera limpia y libre de organismos o cuerpos extraños. Aquellas muestras donde se observó contaminación se descartaron, mientras que las muestras de hemolinfa limpia, sin cuerpos extraños, se juntaron y se mantuvieron en un baño de hielo picado para evitar la agregación de los hemocitos hasta haber obtenido toda la hemolinfa necesaria. La viabilidad celular se evaluó con azul de tripano, asegurando así que los hemocitos estuvieran vivos. A continuación, la hemolinfa se centrifugó (640xg, 4°C, 10 min) con el objetivo de separar los hemocitos del plasma.

#### 4.2.3 Separación hemocitaria

La separación de las células de la hemolinfa de *O. edulis* se realizó mediante el uso de gradientes de Percoll, siguiendo los procedimientos descritos por Xue *et al.* (2000). Utilizando una cámara de recuento celular Malassez, se realizó el conteo de los hemocitos presentes en el pellet; las células se concentraron o disolvieron en MAS, hasta conseguir aproximadamente  $7 \times 10^6$  de células por cada 2 mL de MAS. Este volumen se colocó sobre un gradiente discontinuo de Percoll, (0, 41% NaCl, 1100 mOSm en MAS), con los porcentajes de Percoll de 70%, 50%, 30% y 10%. Se procedió a una nueva centrifugación (640xg, 4°C, 10 min) con el objetivo de recoger posteriormente los distintos tipos celulares en las interfases entre las diferentes densidades. Tras la centrifugación se procedió a succionar con una aguja de punta roma la interfase 70%-50%, donde se acumuló la subpoblación celular de granulocitos, y la interfase 30%-10%, con la subpoblación hemocitaria de hialinocitos (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema representativo de la separación de tipos hemocitarios a partir de hemolinfa de *O. edulis*, en radiante de Percoll; se indican los porcentajes de Percoll y las interfases donde se encuentran los distintos tipos hemocitarios.

Macroscópicamente, en dichas interfases se observaba una zona amplia blanquecina que correspondía a la acumulación de las células.

#### 4.2.4 Observación de la morfología de los hemocitos

Una vez separados los tipos hemocitarios, se realizó un nuevo conteo celular en cámara Malassez y se evaluó la viabilidad celular con azul de tripano. Posteriormente se realizó una citocentrifugación de sendas alícuotas de cada tipo hemocitario siguiendo el protocolo de da Silva & Villalba (2004); una alícuota de cada tipo celular se diluyó en la solución antiagregante MAS (Bachère *et al.*, 1988) hasta un volumen final de 150  $\mu$ L, dicha muestra se colocó dentro de un microvial agujereado en su base y acoplado a un portaobjetos mediante un soporte específico para la citocentrifugación. La muestra centrifugada ( $92\times g$ ,  $4^{\circ}C$ , 5 min) pasó a través del orificio del fondo del microvial al portaobjetos donde los hemocitos quedaron retenidos en una superficie circular de 8 mm de diámetro formando una monocapa celular. Ésta se dejó secar al aire, se fijó y se tiñó con el equipo de tinción rápida Hemacolor (Merck) (1 min en la solución 1, [fijación con metanol], 2 min en la solución 2, 2 min en la solución 3 y 2 inmersiones de lavado en agua destilada). Una vez teñidas y secas, las monocapas se montaron con el medio de montaje DePeX. Por



último, se examinaron las células con microscopio óptico para confirmar que la separación hemocitaria se había realizado con éxito.

Tanto la separación hemocitaria como la posterior evaluación de la morfología de los hemocitos para confirmar una correcta separación y viabilidad celular se realizó repetidamente hasta acumular  $20 \times 10^6$  células de cada tipo hemocitario. Muestras de  $20 \times 10^6$  hialinocitos y  $20 \times 10^6$  granulocitos se congelaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su posterior utilización.

#### **4.2.5 Extracción proteica**

Las muestras congeladas a  $-80^\circ\text{C}$  se disolvieron en tampón de lisis (7.6 M Urea, 2 M Thiourea, 4% Chaps, trazas de azul de Bromofenol, 0.2% Anfolito, pH 3-10 y 100 mM DTT) y PMSF (inhibidor de proteasas) durante 2 horas y 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  con agitación. A continuación, se centrifugaron a  $16.000 \times g$  durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . El sobrenadante se purificó con un kit comercial ReadyPrep<sup>TM</sup> 2-DCleanup (BioRad) y finalmente, las muestras se resuspendieron en 400  $\mu\text{l}$  de solución de rehidratación (7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% Chaps, trazas de azul de Bromofenol, 0.3% DTT y 0.5% IPG (gradiente de pH inmovilizado)) congelándose a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

La concentración proteica de las muestras se determinó mediante el kit RC DC Protein Assay (BioRad) basado en el protocolo de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

#### **4.2.6 Electroforesis bidimensional 2-DE**

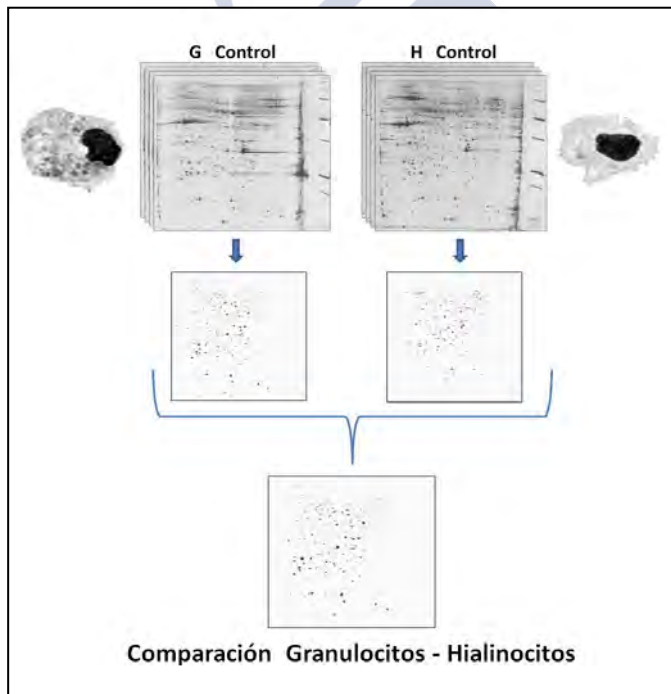
Para llevar a cabo el Isoelectroenfoco (IEF) se cargaron 300  $\mu\text{g}$  de proteína resuspendida en 400  $\mu\text{l}$  de solución de rehidratación en tiras de inmovilinas de gradiente de pH (IPGs) de 17 cm y pH 5-8. Tanto el proceso de equilibrado como la segunda dimensión (SDS-PAGE) se realizó exactamente como se describe en el apartado 3.2.5.



#### 4.2.7 Análisis de imagen y comparativa entre geles

El análisis proteómico se realizó de manera cualitativa con el programa informático PDQuest 8.0.1 (BioRad) como se explica en el apartado 3.2.6.

Se compararon los dos tipos celulares presentes en la hemolinfa de la ostra europea. La Figura 6 muestra las distintas comparaciones que se llevaron a cabo en este estudio.



**Figura 6.** Esquema representativo de la comparación realizada entre los geles correspondientes a granulocitos y los de hialinocitos

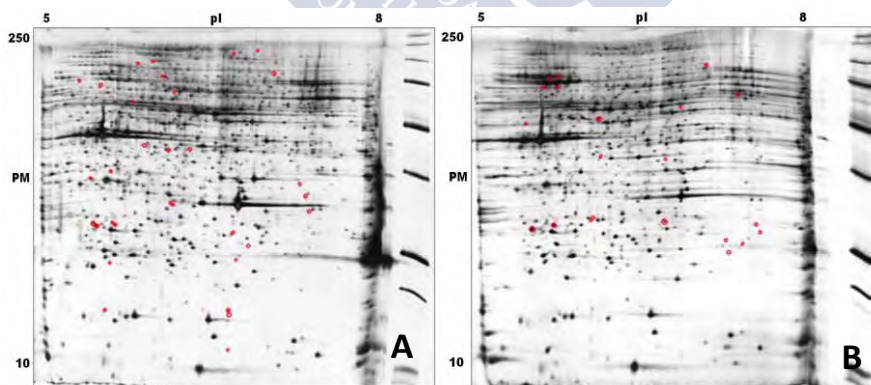
#### 4.2.8 Espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos

El análisis mediante espectrometría de masas y la búsqueda en las bases de datos se llevaron a cabo como se explica en el apartado 3.2.7.

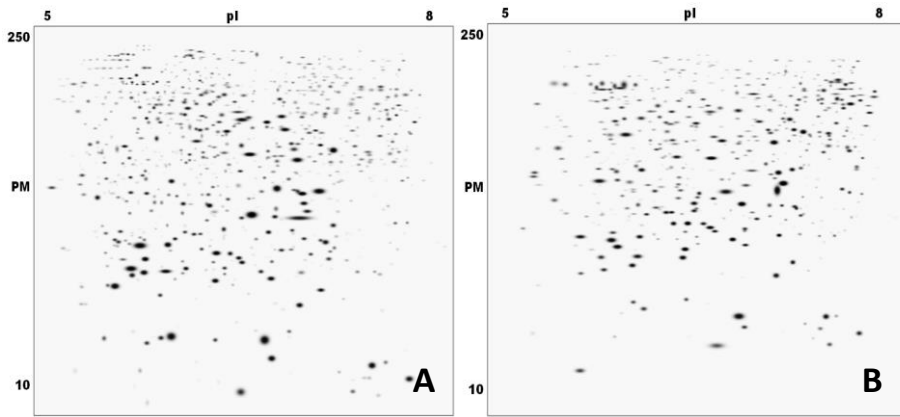
### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* mediante electroforesis bidimensional

Al analizar el patrón proteico de los tipos hemocitarios de *Ostrea edulis* por separado se detectaron una media de 1130 marcas proteicas en los geles bidimensionales de **Granulocitos** y marcas proteicas en los de **Hialinocitos** (Figura 7). En el primer caso se encontraron 850 marcas comunes a todas las réplicas, mientras que en el segundo hay 539 marcas estaban presentes en todos los geles del grupo (Figura 8). Comparando los 2 tipos celulares se pudieron detectar 470 marcas proteicas comunes a ambos grupos, 32 marcas exclusivas de granulocitos, es decir, que sólo aparecen en este tipo celular, y 21 exclusivos de hialinocitos (Figura 7). Dicho análisis se resume en la Tabla 1.



**Figura 7.** Geles bidimensionales representativos de las proteínas expresadas en los hemocitos de *Ostrea edulis*. **Granulocitos** (A) e **Hialinocitos** (B). Los círculos rojos indican aquellas marcas exclusivas de cada grupo. pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.



**Figura 8.** Mapas sintéticos de las marcas proteicas comunes a las cuatro réplicas de los geles de **Granulocitos** (A) e **Hialinocitos** (B) de *Ostrea edulis*. El peso molecular (PM) y el punto isoeléctrico (pI) se indican en los ejes vertical y horizontal respectivamente.

**Tabla 1.** Resumen del análisis de geles 2-DE, donde se incluye el número medio de marcas proteicas en los 4 geles de cada clase, el número de marcas comunes a las 4 réplicas de cada clase y el número de marcas comunes, específicas e identificadas en la comparación entre los tipos hemocitarios de *Ostrea edulis*.

Tipos hemocitarios	Nº medio de "marcas en los 4 geles	Nº de marcas comunes a las 4 réplicas de cada grupo	Comparación entre grupos		
			Nº marcas comunes	Nº marcas exclusivas	Nº marcas identificadas
Granulocitos	1130	850	470	32	23
Hialinocitos	872	539		21	16

#### 4.3.1.1 Identificación proteica

##### 4.3.1.1.1 Granulocitos

De las 32 marcas proteicas exclusivas de granulocitos se lograron identificar 23. La Figura 9 muestra la ubicación de las proteínas identificadas de granulocitos, cada una representada por un círculo rojo y un número que coincide con el código presente en la Tabla 2.

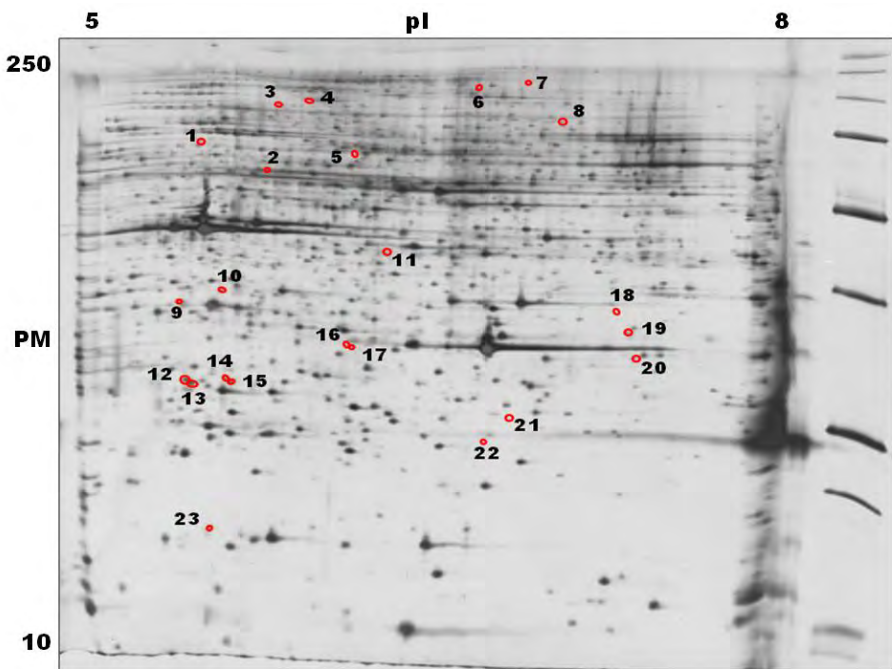
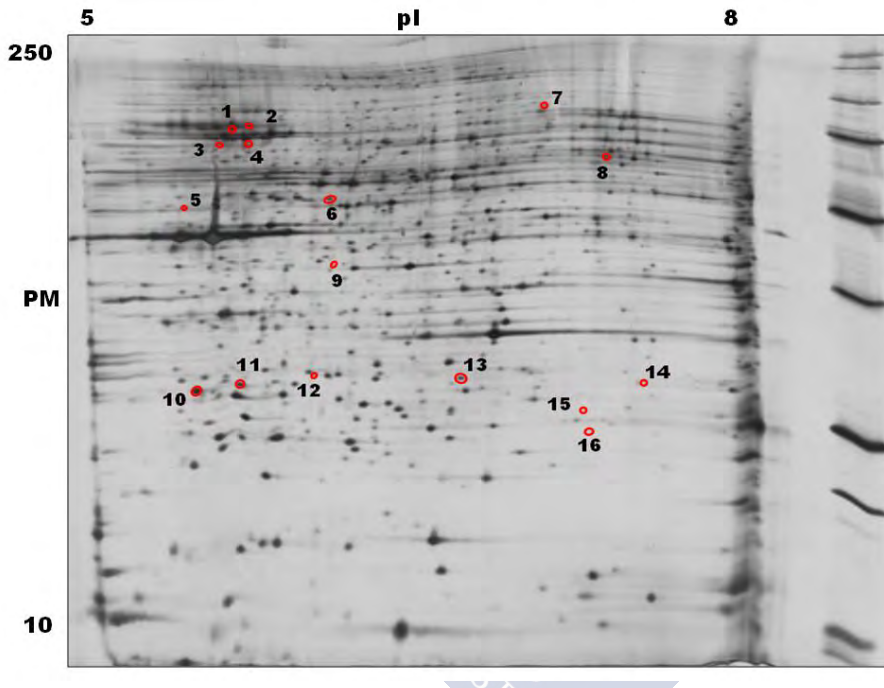


Figura 9. Gel bidimensional representativo de las proteínas expresadas en los Granulocitos de *Ostrea edulis*. Las marcas proteicas correspondientes a proteínas identificadas se aparecen numerados y marcados en rojo. pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.

Dentro de las 23 proteínas identificadas se han detectado 3 proteínas que presentan isoformas, puesto que en estos casos se ha detectado la misma proteína de distintas marcas proteicas.

#### 4.3.1.1.2 Hialinocitos

De las 21 marcas proteicas exclusivas de hialinocitos se lograron identificar 16. La Figura 10, presenta la distribución de las proteínas identificadas de hialinocitos, que se muestran en la Tabla 3.



**Figura 10.** Gel bidimensional representativo de las proteínas expresadas en los Hialinocitos de *Ostrea edulis*. Las marcas proteicas correspondientes a proteínas identificadas aparecen numerados y marcados en rojo. pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.

Del mismo modo que ocurre en granulocitos, en hialinocitos se han encontrado 3 proteínas que presentan isoformas.

En todos los casos en los que se han identificado proteínas hipotéticas, la secuencia de aminoácidos identificada coincide con la secuencia de una proteína de ostra de la que no se conoce su nombre ni función.

**Tabla 2.** Lista de proteínas identificadas de **Granulocitos** de ostras *Ostrea edulis*. **pl:** punto isoelectrico. **PM:** peso molecular. **Teo:** Valor teórico. **Exp:** valor experimental. **SCORE:** mejor alineamiento entre la longitud de la secuencia obtenida y la secuencia presente en la base de datos NCBI después de la búsqueda BLAST (a mayor “score”, mejor emparejamiento). **E-VALUE:** es el número de alineaciones distintas, con una puntuación igual o mejor que el “Score”, que se espera que ocurra en una búsqueda de base de datos debido al azar (a menor “E-value”, mejor emparejamiento). **OYSTER SCORE:** mejor alineamiento con la base de datos genómica y aminoacídica específica para *Ostrea edulis* creada por el Grupo Acuigen (Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Campus de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela), como parte del proyecto OYSTERCOVER (Pardo *et al.*, 2016). **SECUENCIA:** únicamente se muestra la secuencia con mejor emparejamiento en la base de datos.

CODIGO	PROTEINA	NUMERO DE ACCESO NCBI	PM (Teo) / (Exp)	PI (Teo) / (Exp)	FUNCIÓN BIOLÓGICA	E-VALUE	SCORE NCBI	OYSTER SCORE	SECUENCIA
G1	$\alpha$ -Manosidasa lisosomal [C. gigas]	EKC30994.1	110,47/73,8	8,87/5,59	Digestión	4e-16	72,7	114	RRPIQAADNFVTILN PMEIRT
G2 (isoforma)	Proteína bifuncional birA [C. gigas]	EKC41441.1	51,04/64,05	6,04/5,89	Regulación de transcripción	3e-20	85,5	138	MDDAKLGGIQQGDP QGTIYSEIQNKA
G3	Enzima de conjugación de ubiquitina E2W [C. gigas]	EKC37697.1	18,14/111,90	8,65/5,94	Degradación proteica, apoptosis	0,028	30,8		MASMEKRLE
G4	Actina tipo I, parcial [O. edulis]	CAL69229.1	22,81/115	4,83/6,09	Movilidad celular	9e-21	87,2		KEKLCYVALDFEQE MATAASSSLEKS
G5 (isoforma)	Proteína bifuncional birA [C. gigas]	EKC41441.1	51,04/73,8	6,04/6,24	Regulación de transcripción	3e-20	85,5	138	MDDAKLGGIQQGDP QGTIYSEIQNKA
G6	Proteína 2 relacionada con lipasa pancreática [C. gigas]	EKC18175.1	98,99/125	7,50/6,77	Metabolismo lipídico	3e-17	76,1	129	KYVGCFFNLPFFDN AAVDLPRS

CODIGO	PROTEINA	NUMERO DE ACCESO NCBI	PM (Teo) / (Exp)	PI (Teo) / (Exp)	FUNCIÓN BIOLÓGICA	E-VALUE	SCORE NCBI	OYSTER SCORE	SECUENCIA
G7	Proteína 38 que contiene motivos tripartitos (TRIM38) [C. gigas]	EKC34091.1	43,19/135	6,87/7,00	Señalización celular, apoptosis	2e-12	62,6	107	MAAIISSKYPILGSPQ EHIPMCKEKH
G8	deshidrogenasa subunidad 5 [Onchidella celtica]	YP_002791083.1	59,26/88,10	8,62/7,12	Metabolismo energético	0,019	31,2		AVMVMFNMS
G9	Proteína 13 con repeticiones Anquirina y SOCS box [C. gigas]	EKC20901.1	32,64/37,00	9,26/5,50	Señalización celular	1e-20	86,7	134	RQDVSLILLLLACGA DVTARNINGLRP
G10	Glutatión S-transferasa 3 [C. gigas]	EKC31443.1	24,94/39,49	5,69/5,69	Detoxificación, apoptosis	0,89	26,5		DDKESAMLD
G11	Potenciador de conector supresor quinasa de Ras 2 [C. gigas]	EKC38456.1	136,22/45,85	7,43/6,39	Señalización celular, apoptosis	2e-17	76,6	120	RSLRYDYETENLQS LALQLGCKA
G12 (isoforma)	Inhibidor 1 de disociación GDP Rho [C. gigas]	EKC31723.1	23,57/29,54	5,15/5,50	Señalización celular	2e-16	73,6	115	KETAHEYLTPIDEA PSGMLVRG
G13 (isoforma)	Inhibidor 1 de disociación GDP Rho [C. gigas]	EKC31723.1	23,57/29,1	5,15/5,60	Señalización celular	2e-16	73,6	115	KETAHEYLTPIDEA PSGMLVRG
G14 (isoforma)	Proteína PSF2 del complejo GINS de replicación de ADN [C. gigas]	XP_011432158.1	20,96/29,97	5,39/5,69	Replicación del ADN	1e-16	74	113	KFFTKMPCDHYIEV TQLLKS
G15 (isoforma)	Inhibidor 1 de disociación GDP Rho [C. gigas]	EKC31723.1	23,57/29,24	5,15/5,72	Señalización celular	2e-16	73,6	115	KETAHEYLTPIDEA PSGMLVRG



Estudio proteómico de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* mediante electroforesis bidimensional

CODIGO	PROTEINA	NUMERO DE ACCESO NCBI	PM (Teo) / (Exp)	PI (Teo) / (Exp)	FUNCIÓN BIOLÓGICA	E-VALUE	SCORE NCBI	OYSTER SCORE	SECUENCIA
G16	N-acetilglucosaminidasa β-1,6-N-acetilglucosaminil transferasa [ <i>C. gigas</i> ]	EKC36668.1	29,66/33,80	6,53/6,22	Síntesis de hidratos de carbono	5e-18	78,3	118	RLKADLNCMSDLLN YSDVNWKY
G17	Desconocida [ <i>Lymnaea stagnalis</i> ]	AAS86732.1	17,38/31,73	6,91/6,24	Desconocida	0,22	30,8		NFGSGCEGNMSASS LGGGMNG
G18	S13 proteína ribosomal 40S [ <i>C. gigas</i> ]	XP_011441368.1	17,43/35,98	10,51/7,34	Síntesis proteica	4e-15	69,8	118	KKGLTPSQIGVILGD SHGVAQYRF
G19	Factor elongación 1 alfa (Fragmento) [ <i>Mytilus galloprovincialis</i> ]	ACD65472.1	15,25/33,78	7,91/7,42	Traducción proteica	1e-16	74	115	REHALLAFTLGVKQ MIVGVNKM
G20	Proteína 4 con repeticiones F-box/LRR [ <i>C. gigas</i> ]	EKC24784.1	18,59/31,88	8,72/7,48	Reconocimiento proteico	3e-18	78,7	121	KAGTWEIDAVEM VGTRFNFGKF
G21 (isoforma)	Proteína PSF2 del complejo GINS de replicación de ADN [ <i>C. gigas</i> ]	XP_011432158.1	20,96/27,34	5,39/6,94	Replicación del ADN	1e-18	74	113	KFFTKMPCDHYIEV TQLLLS
G22	Factor de mortalidad 4 [ <i>Aplysia californica</i> ]	ADM34181.1	11,81/25,85	9,19/6,81	Proliferación celular, apoptosis	9e-18	77	119	KNGPNYFKISNYEIA TPDYHRK
G23	Proteína de choque térmico HSP90a 1 [ <i>C. gigas</i> ]		83,32/19,2	4,87/5,70	Respuesta a estrés			84	RYAVLDVHYETEGS RT

**Tabla 3.** Lista de proteínas identificadas de Hialinocitos de ostras *Ostrea edulis*. pi: punto isoelectrico. PM: peso molecular. Teo: Valor teórico. Exp: valor experimental. SCORE: mejor alineamiento entre la longitud de la secuencia obtenida y la secuencia presente en la base de datos NCBI después de la búsqueda BLAST (a mayor “score”, mejor emparejamiento). E-VALUE: es el número de alineaciones distintas, con una puntuación igual o mejor que el “Score”, que se espera que ocurra en una búsqueda de base de datos debido al azar (a menor “E-value”, mejor emparejamiento). OYSTER SCORE: mejor alineamiento con la base de datos genómica y aminoacídica específica para *Ostrea edulis* creada por el Grupo Acuigen (Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Campus de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela), como parte del proyecto OYSTERCOVER (Pardo *et al.*, 2016). SECUENCIA: únicamente se muestra la secuencia con mejor emparejamiento en la base de datos.

CODIGO	PROTEINA	NUMERO DE ACCESO NCBI	PM (Teo) / (Exp)	pi (Teo) / (Exp)	FUNCIÓN BIOLÓGICA	E-VALUE	SCORE NCBI	OYSTER SCORE	SECUENCIA
H1 (isoforma)	Lacasa 24 [C. gigas]	EKC26596.1	82,00/73,75	5,47/5,64	Defensa celular	2e-10	56,2	121	KGGSVHHPHMHGHTFEVLKMM
H2 (isoforma)	Lacasa 1 [O. edulis]	AFA34430.1	26,60/73,75	5,41/5,71	Defensa celular			126	KSDITLLNCPFENYPNQPLRKC
H3 (isoforma)	Actina [C. gigas]	EKC39169.1	41,82/67,5	5,30/5,59	Movilidad celular	2e-14	66,4	103	KYPIEHGIVTNWDDMEKI
H4 (isoforma)	Actina [C. gigas]	EKC30049.1	41,82/66,25	5,30/5,70	Movilidad celular	6e-19	80,8	125	RKDLYANTVLSGGTMYYPGIADRM
H5 (isoforma)	Actina [C. gigas]	EKC39169.1	41,82/48,56	5,30/5,45	Movilidad celular	5e-14	66	104	RVAPEEHPVLLTEA PLNPKA
H6	Proteína hipotética CGI_10004689, parcial [C. gigas]	EKC24315.1	52,02/49,13	6,37/6,05	Desconocida			115	RDYVDQFPFENIVFEGGGAKG
H7	Proteína similar a Transcetolasa 2 [C. gigas]	EKC40969.1	74,87/66,25	6,87/7,12	Metabolismo de los carbohidratos	1e-13	64,7	100	RSIPGSTVYFYPDAVSTERA
H8	Flotilina 2 [C. gigas]	EKC35912.1	49,52/57,50	5,25/7,38	Transducción de señales	6e-18	77,8	118	KASAYKQYGEAAML SLVLETLPKI
H9	Metionina adenosiltransferasa [Leptochiton asellus]	AEZ54270.1	35,00/39,26	8,07/6,10	Respuesta al estrés	6e-20	83,8	122	KTGMVLYCGEITSN AVVDYQKIIRN

Estudio proteómico de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* mediante electroforesis bidimensional

CODIGO	PROTEINA	NUMERO DE ACCESO NCBI	PM (Teo) / (Exp)	pI (Teo) / (Exp)	FUNCIÓN BIOLÓGICA	E-VALUE	SCORE NCBI	OYSTER SCORE	SECUENCIA
H10 (isoforma)	Inhibidor 1 de disociación GDP Rho [C. gigas]	EKC31723.1	23,57/24,67	5,15/5,50	Señalización celular	1e-16	73,6	115	KETAHEYLTPIDEAP SGMLVRG
H11 (isoforma)	Inhibidor 1 de disociación GDP Rho [C. gigas]	EKC31723.1	23,57/24,78	5,15/5,69	Señalización celular	1e-16	73,6	115	KETAHEYLTPIDEAP SGMLVRG
H12	Similar a Piridoxina-5'-fosfato oxidasa isoforma 4 [C. gigas]	XP005109140.1	27,01/ 27,59	6,37/6,78	Antioxidante	2e-04	51,1	84	RPTSMFWQGGQTN RL
H13	Proteína hipotética CGI_10009700 [C. gigas]	EKC37927.1	40,41/ 27,59	5,58/6,77	Desconocida			131	RAEHLTHVATEEK NPLPSAEAIKE
H14	Proteína hipotética CGI_10013166 [C. gigas]	EKC32776.1	12,85/28,04	4,86/7,53	Desconocida	0,013	32,5		PELLKKVDTSTR
H15	Proteína p53 que contiene dominio de repeticiones de Anquirina [C. gigas]	XP_011419041.1	60,69/25,65	9,30/7,23	Señalización celular	2e-17	76,6	118	RLALHPPKPEYITNL TDEYPRD
H16	Proteína similar a cemento [Pinctada margaritifera]	H2A0L9.1	32,5/23,67	9,52/7,32	Estructura	3e-04	40,1		SSSSGGSCGGGGG HSGGAPTGGGMGG GS

#### 4.4 DISCUSIÓN

Los patrones de expresión proteica difieren considerablemente entre los distintos tipos hemocitarios de *Ostrea edulis*, detectándose mayor número de marcas proteicas en las muestras de granulocitos tanto en el número medio de marcas en los geles como en el número de marcas comunes a todas las réplicas. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores en los que se ha demostrado una mayor cantidad de enzimas en granulocitos (López *et al.*, 1997a; Pipe *et al.*, 1997; Cochenec-Laureau *et al.*, 2003a). Los granulocitos son considerados los principales hemocitos inmunocompetentes en la ostra *C. gigas*, ya que poseen mayor capacidad fagocítica, mayor expresión de genes relacionados con el sistema inmune y mayor producción de moléculas con propiedades antimicrobianas e implicadas en la respuesta inmune (Wang *et al.*, 2017).

Al comparar los patrones de marcas entre tipos hemocitarios, el carácter muy conservador del procedimiento experimental para aceptar una marca proteica como exclusiva de un tipo celular, (marcas presentes en todas las réplicas del tratamiento en cuestión, claramente separadas de otras, de intensidad adecuada e inequívocamente ausentes en todas las réplicas del tratamiento con que se compara), limitó el número de marcas consideradas exclusivas de cada tipo, resultando también mayor en el caso de granulocitos.

Una buena parte de las marcas proteicas exclusivas de cada tipo pudieron ser identificadas. En ambos tipos hemocitarios se detectaron proteínas correspondientes a funciones diversas (Tabla 4). Se encontraron discrepancias notables entre los valores teóricos del peso molecular y/o punto isoeléctrico (pI) de algunas de las proteínas identificadas y los valores observados según la posición de las manchas en los geles. Estas discrepancias podrían corresponder a isoformas generadas por una variedad de causas, incluidas las modificaciones postraduccionales, el empalme alternativo y la aparición de familias multigénicas (De La Fuente *et al.*, 2011). Un único cambio de aminoácido o una modificación postraduccional (PTM) puede alterar el punto isoeléctrico de una proteína

significativamente, además las isoformas de proteínas homólogas pueden ocurrir fuera del intervalo de pH que se analiza (Fields *et al.*, 2012). Por otro lado, se detectaron diversas isoformas tanto en granulocitos como en hialinocitos, proteínas que encontrándose en diferentes posiciones en el gel, con diverso pI y peso molecular, fueron identificadas como la misma proteína. La abundancia de isoformas de la misma proteína puede deberse a diferentes modificaciones postraduccionales o a combinaciones de dichas modificaciones (Walsh *et al.*, 2005). Modificaciones postraduccionales como glutacionilación, acetilación, fosforilación, sulfilación y sialilación cambian el pI de las proteínas (Rodríguez-Ortega *et al.*, 2003). Las modificaciones postraduccionales son de gran interés al ser clave en el control y la modulación de muchos procesos dentro de la célula, las interacciones entre proteínas requieren la presencia de ciertas modificaciones postraduccionales (Pawson & Nash, 2003; Wilkins & Appel, 2007). Estas isoformas conllevan diferentes patrones de respuesta de la expresión de la proteína, lo que indica que pueden estar involucradas en diferentes procesos biológicos (G. Chen *et al.*, 2011).

**Tabla 4.** Lista de proteínas identificadas en marcas proteicas exclusivas de cada tipo hemocitario, agrupadas por función biológica.

Función biológica	Proteína identificada	Tipo hemocitario
Transducción de señales	- Enzima de conjugación de ubiquitina E2W (UBE2W)	Granulocito
	- Proteína 38 que contiene motivos tripartitos (TRIM38)	
	- Proteína 13 que contiene repeticiones de anquirina y SOCS box (ASB-13)	
	- Potenciador de conector supresor quinasa de Ras 2 (CNKSR2)	
	- Factor elongación 1 alfa (EF1- $\alpha$ o eEF1A)	
	- Proteína 4 con repeticiones F-box/LRR	
	- Proteína de choque térmico HSP90 $\alpha$ 1	
	- Flotillina 2	Hialinocito
	- Proteína p53 que contiene dominio de	

	repeticiones de anquirina	
Apoptosis	- Inhibidor 1 de disociación GDP Rho	Ambos tipos
	- Glutatión S-transferasa 3 (GTS3)	
	- N-acetilactosaminida $\beta$ -1,6-N-acetilglucosaminil transferasa (GlcNAcT)	
	- Factor de mortalidad 4 (Fragmento) (MORF4)	
	- Enzima de conjugación de ubiquitina E2W (UBE2W)	
	- Proteína 38 que contiene motivos tripartitos (TRIM38)	Granulocito
Procesos redox	- Proteína 13 que contiene repeticiones de anquirina y SOCS box (ASB-13)	
	- Potenciador de conector supresor quinasa de Ras 2 (CNKSR2)	
	- Factor elongación 1 alfa (EF1- $\alpha$ o eEF1A)	
	- Proteína p53 que contiene repeticiones de anquirina	Hialinocito
Citoesqueleto	- NADH deshidrogenasa subunidad 5	Granulocito
	- Glutatión S-transferasa 3 (GTS3)	
	- Lacasa 24	
	- Lacasa 1	
	- Proteína similar a transcetolasa 2 (TKT2)	Hialinocito
Digestión	- Metionina adenosiltransferasa	
	- Piridoxina-5'-fosfato oxidasa isoforma X5 (PNPO)	
	- Factor elongación 1 alfa (EF1- $\alpha$ o eEF1A)	
Otras	- Proteína de choque térmico HSP90 $\alpha$ 1	Granulocito
	- Flotilina 2	Hialinocito
Digestión	- Actina	Ambos tipos
	- $\alpha$ -Manosidasa lisosomal	
Otras	- Proteína 2 relacionada con lipasa pancreática	Granulocito
	- Proteína bifuncional birA	
	- Proteína PSF2 del complejo GINS de replicación de ADN	Granulocito
	- S13 proteína ribosomal 40S	
	- Proteína similar a cemento	Hialinocito

#### 4.4.1 Proteínas identificadas implicadas en vías de señalización

El sistema inmune innato está bajo control de una compleja red de vías de señalización conservadas evolutivamente, que se activan dependiendo de diferentes estímulos o invasiones. Las cascadas de señalización celular coordinan la inducción de numerosos genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria (Song *et al.*, 2010). De las 39 proteínas identificadas, 10 estaban implicadas en transducción de señales, 7 de ellas correspondían a marcas específicas de granulocitos, 2 a marcas específicas de hialinocitos y varias marcas específicas de granulocitos y otras específicas de hialinocitos correspondían a isoformas de una misma proteína.

Una de las marcas proteicas exclusivas de granulocitos correspondía a la enzima de conjugación de ubiquitina E2W (UBE2W). La proteólisis dependiente de ubiquitina (Ub) regula la abundancia de proteínas y tiene una función reguladora principal en muchos procesos biológicos como la regulación del ciclo celular, transducción de señales, regulación transcripcional, reparación del ADN, respuesta inflamatoria, y presentación de antígenos en células eucariotas. La ubiquitinación de una proteína diana tiene como objeto la degradación por unión covalente con ubiquitina e implica la reacción enzimática de múltiples etapas catalizadas por una cascada enzimática incluyendo enzimas de activación (E1s), de conjugación (E2s) y ligasas (E3s) de ubiquitina (Ciechanover *et al.*, 2000; Hershko & Ciechanover, 1998; Nandi *et al.*, 2006). El sistema ubiquitina proteosoma está implicado en señalización inmune, desarrollo y muerte celular programada (Yamamoto *et al.*, 2006). En la oreja de mar *Haliotis diversicolor supertexta* se ha identificado una enzima de conjugación de ubiquitina E2 cuya expresión aumenta en los hemocitos después del enfrentamiento con lipopolisacáridos (LPS) y ácido poliinosínico: policitidílico (Poly I:C, ARN de cadena doble sintético), ambos usados como inductores de respuesta inmune antibacteriana y antivírica, respectivamente, lo que sugiere la implicación de esta enzima en la respuesta inmune de moluscos (Ye *et*



*al.*, 2013). Existen evidencias de la participación del gen UBE2 en la respuesta inmune del molusco gasterópodo *Concholepas concholepas* frente a una infección bacteriana (Núñez-Acuña *et al.*, 2012).

Otra de las marcas exclusivas de granulocitos correspondió a la proteína 38 que contiene motivos tripartitos (TRIM38). Las proteínas que contienen motivos tripartitos (TRIM) participan activamente en la transducción de señales, teniendo un papel esencial en la regulación de la inmunidad innata (Kawai & Akira, 2011; McNab *et al.*, 2011; Ozato *et al.*, 2008). Estudios recientes han demostrado que la activación de varias vías de señalización de suma importancia en el sistema inmune, como NF- $\kappa$ B, están reguladas por múltiples moléculas, incluyendo la familia de proteínas TRIM (Kawai & Akira, 2011). En moluscos, TRIM es uno de los genes implicado en la respuesta antiviral (He *et al.*, 2015), siendo un factor inmune importante también en ostras (Guo *et al.*, 2015; Guo & Ford, 2016). Concretamente la sobreexpresión de TRIM38 produce la activación de la vía de señalización NF- $\kappa$ B (Matsuda *et al.*, 2003). Dicha proteína está fuertemente implicada en la inmunidad antiviral, por lo que ciertos virus podrían modular la expresión de estas proteínas con el objetivo de evadir la defensa del hospedador (Zhao *et al.*, 2012).

Otra marca específica de granulocitos correspondió a la proteína 13 que contiene repeticiones de anquirina y SOCS box (ASB-13). Las proteínas con dominios de repeticiones de anquirina y SOCS box (ASB) están implicadas en la señalización celular del sistema inmune (Kamura *et al.*, 1998). Las proteínas supresoras de señalización de citoquinas (SOCS) son inhibidores de las vías de señalización de citoquinas; se trata de reguladores fisiológicos clave del sistema inmune (Yoshimura *et al.*, 2007), que controlan el exceso de citoquinas e inhiben una variedad de vías de transducción de señales, en particular vías JAK-STAT (quinasas Janus-Transductor de señales y activador de la transcripción) (Croker *et al.*, 2008; Yoshimura *et al.*, 2007). Son indispensables para la regulación de muchos procesos bioquímicos, incluyendo la determinación del destino celular y la regulación inmune (Elliott & Johnston, 2004). SOCS son importantes

mediadores de retroalimentación negativa en respuesta a gran cantidad de citoquinas. Estas proteínas contienen otros dominios que potencialmente pueden mediar interacciones proteína-proteína como las repeticiones de anquirina (Park *et al.*, 2003), que participan en la activación de la vía de señalización NF- $\kappa$ B (Baldwin, 1996). La activación de NF- $\kappa$ B es esencial en el inicio de la inflamación para la eliminación de patógenos, pero su actividad debe ser estrechamente regulada debido a que la activación fuerte o prolongada de NF- $\kappa$ B puede dar lugar a la producción excesiva de citoquinas con consecuencias gravemente perjudiciales para el organismo (Yoshimura *et al.*, 2005). De manera que la correcta regulación de este sistema, donde participa la proteína ASB, es esencial para una respuesta inmune eficaz, no excesiva, por tanto para la supervivencia del individuo. Se ha demostrado la implicación de proteínas SOCS en el sistema inmune de ostras *Pinctada fucata* (Liu *et al.*, 2013). SOCS tiene un papel destacado en la respuesta inmune innata de la ostra *C. gigas* frente al virus OsHV-1 (Pauletto *et al.*, 2017). Además los niveles de expresión de la citoquina IL-17 son mucho mayores en granulocitos que en hialinocitos de *C. gigas* (Wang *et al.*, 2017).

Otra de las marcas proteicas exclusivas de granulocitos se identificó como potenciador de conector supresor quinasa de Ras 2 (CNKSR2). La cascada de quinasa Ras/Raf/proteínas quinasa activada por mitógenos (MEK)/quinasa reguladas por señales extracelulares (ERK), llamada simplemente cascada de señalización Ras-ERK, juega un papel importante en la proliferación, diferenciación, apoptosis y transformación oncogénica (Chang & Karin, 2001; Lewis *et al.*, 1998; Matsunaga-Udagawa *et al.*, 2010; Sturgill & Wu, 1991). El potenciador de conector supresor de quinasa de Ras (CNKSR), es capaz de regular la activación de dicha vía de señalización (Anselmo *et al.*, 2002; Brennan *et al.*, 2011; Clapéron & Therrien, 2007). CNKSR2 se ha identificado entre los genes implicados en la respuesta inmune de moluscos (Wu *et al.*, 2011)

El factor elongación 1 alfa (EF1- $\alpha$  o eEF1A) correspondió a otra de las marcas proteicas exclusivas de granulocitos. EF1- $\alpha$  es un

miembro de la familia de proteínas G y una de las cuatro subunidades que componen el factor de elongación eucariótico (eEF), siendo clave en la traducción de proteínas (Browne & Proud, 2002; Ejiri, 2002). Además EF1- $\alpha$  participa en varios procesos celulares importantes, incluyendo proliferación celular, y transducción de señales (Gangwani *et al.*, 1998; Lamberti *et al.*, 2004).

Otra marca proteica exclusiva de granulocitos se identificó como proteína 4 con repeticiones F-box/LRR. Los dominios de repeticiones ricos en leucina (LRR) son estructuras comunes de numerosas moléculas entre las que se encuentran los receptores Toll y tipo Toll (TLRs), altamente implicados en el sistema inmune (Leulier & Lemaitre, 2008). Las proteínas con dominios LRR participan en muchos procesos biológicamente importantes, tales como interacciones proteína-proteína, procesos de reconocimiento o reacciones inmunes (Chai *et al.*, 2010). Dichos dominios reconocen y se unen a patrones moleculares asociados a patógenos específicos (PAMPs) (He *et al.*, 2015). Uno de los dominios inmunes de organismos bivalvos es LRR (Gómez-Chiarri *et al.*, 2015), como ocurre en la ostra *C. virginica* (L. Zhang *et al.*, 2014). En *C. gigas* los dominios LRR están implicados en la inmunidad antiviral (Green *et al.*, 2015a). La familia de proteínas F-box participa en poliubiquitinación y proteólisis (Buckley & Somero, 2009; Thomas, 2006), además se ha observado a F-box como uno de los genes cuya expresión varía en *C. virginica* infectado por *Perkinsus marinus* (Wang *et al.*, 2010).

La proteína de choque térmico HSP90 $\alpha$  1 correspondió a otra de las marcas proteicas exclusivas de granulocitos. Las proteínas de choque térmico (HSPs) son una familia de proteínas que ayudan a los organismos a modular la respuesta al estrés y proteger a los organismos de daños inducidos por el medio ambiente celular (Feder & Hofmann, 1999; Lindquist & Craig, 1988). Además, su actividad está estrechamente relacionada con la respuesta inmune innata (Tsan & Gao, 2009). HSP90 es una chaperona molecular envuelta en numerosos procesos biológicos como son plegamiento y estabilización

de gran número de proteínas como quinasas, factores de transcripción y moléculas de señalización celular (Hahn, 2009; Pratt & Toft, 2003; Yahara *et al.*, 1998). HSP90 $\alpha$  1 está implicado en la señal de transducción de un receptor de hormonas esteroideas (Sanchez, 2012); estas hormonas están implicadas en reproducción, inflamación y función inmune (Bahat *et al.*, 2014). Se ha observado un incremento en la síntesis de HSP90 en berberechos *Cerastoderma edule* afectados por neoplasia diseminada (Díaz *et al.*, 2010) y un aumento de su expresión en *O. edulis* infectada por *B. ostreae* (Morga *et al.*, 2012), mientras que la expresión de la proteína HSP90 $\alpha$  1 disminuye en ostras *C. gigas* enfrentadas a OsHV-1 (Corporeau *et al.*, 2014). La HSP90 $\alpha$  1 se ha identificado mediante la base de datos OYSTERECOVER (Pardo *et al.*, 2016), no mediante la base de NCBI.

Una de las marcas proteicas exclusivas de hialinocitos correspondió a flotillina 2. Las flotillinas están presentes de manera preferente en dominios de membrana insolubles en detergente y enriquecidos en glicolípidos (Bickel *et al.*, 1997) implicados en gran variedad de procesos celulares; entre otros en transducción de señales (Bared, 2004; Bickel *et al.*, 1997; Dremina *et al.*, 2005; Hoehne *et al.*, 2005; Langhorst *et al.*, 2007; Rajendran *et al.*, 2003). En bivalvos se ha documentado que flotillina 2 es uno de los genes implicados en la señalización celular cuya expresión varía en almejas *Mya arenaria* como respuesta a la infección bacteriana (Araya *et al.*, 2010).

Otra de las marcas proteicas exclusivas de hialinocitos se identificó como la proteína p53 que contiene repeticiones de anquirina. Las repeticiones de anquirina (AR) están presentes en muchas proteínas biológicamente importantes, y funcionan como reguladores de interacciones específicas proteína-proteína (Ghosh *et al.*, 1998), por lo que tienen gran relevancia en la señalización celular. Proteínas que presentan AR se han encontrado en diversos bivalvos y se consideran moléculas fundamentales en la inmunidad innata (Lee *et al.*, 2013; Montagnani *et al.*, 2008; Mu *et al.*, 2010; Q. Yang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2009). Las AR son responsables de la interacción

con proteínas NF- $\kappa$ B, y por tanto, participan en la activación de la vía de señalización NF- $\kappa$ B (Baldwin, 1996). Los genes con AR se consideran importantes factores relacionados con la inmunidad innata de diferentes ostras (L. Zhang *et al.*, 2014). Se han observado genes de proteínas con dominios AR cuya expresión varía entre ostras *C. gigas* resistentes y susceptibles a la mortalidad estival (Fleury & Huvet, 2012). Genes con AR se han observado con una expresión diferencial en respuesta a una infección bacteriana en varios moluscos (McDowell *et al.*, 2014; K.-J. Wang *et al.*, 2008). Dentro de los genes que más veces se han observado expresados de manera diferencial en respuesta al estrés en bivalvos se encuentran genes con dominios AR (Miao *et al.*, 2015). Además, genes con dominios AR de *O. edulis* presentan una expresión condicionada por la presencia del parásito *B. ostreae* (Martín-Gómez *et al.*, 2012).

Sendas marcas exclusivas de granulocitos e hialinocitos correspondieron a isoformas del inhibidor 1 de disociación GDP Rho (RhoGDI). Los inhibidores de disociación Rho GDP (RhoGDI) son proteínas implicadas en la regulación celular que actúa principalmente controlando la distribución celular y la actividad de Rho GTPasas (Golovanov *et al.*, 2001; Olofsson, 1999). Rho GTPasas son proteínas de señalización intracelular que regulan múltiples vías implicadas en la organización del citoesqueleto, la adhesión, la proliferación, el crecimiento celular y la apoptosis (Hall, 1994; Lacal, 1997; Mulloy *et al.*, 2010). Rho GTPasa son reguladores esenciales de las funciones específicas del tipo celular y de las vías específicas del estímulo en la hematopoyesis (Mulloy *et al.*, 2010). RhoGDI juega un papel importante en la respuesta oxidativa en el interior de fagocitos por la activación de la superóxido dismutasa (SOD) (Ridley, 2001). La expresión de la proteína RhoGDI varía bajo condiciones de estrés en diversos bivalvos como almejas (H. Wu *et al.*, 2013b), mejillones (Tomanek, 2012) y ostras (Luo *et al.*, 2014).

En este estudio, RhoGDI se identificó en varias marcas proteicas con diferentes pesos moleculares y pIs, tanto en granulocitos como en hialinocitos, lo que sugiere la existencia de isoformas distintas. Las

modificaciones postraduccionales son esenciales para que las proteínas desempeñen diversas funciones en eventos celulares variados, produciendo diferentes proteínas de un mismo gen. Estas modificaciones cambian sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Gris & Baldoni, 2013; Nesatyy & Suter, 2008). Un único cambio en un aminoácido o en una PTM puede alterar el punto isoeléctrico de una proteína significativamente (Fields *et al.*, 2012). Por tanto parece que la proteína RhoGDI está presente en ambos tipos celulares pero con diversas modificaciones, lo que hace que aparezcan en el patrón proteico como marcas distintas. Las diferentes isoformas, con diversos pIs y pesos moleculares, tienen como consecuencia funciones biológicas distintas (G. Chen *et al.*, 2011; Gris & Baldoni, 2013). Por tanto, RhoGDI puede participar en vías de señalización implicadas en la regulación del citoesqueleto, adhesión, fagocitosis y apoptosis (Hall, 1994; Lacal, 1997; Mulloy *et al.*, 2010; Ridley, 2001), de manera distinta entre ambos tipos hemocitarios.

Haber identificado en nuestro estudio más proteínas con papeles relevantes en señalización del sistema inmune en granulocitos que en hialinocitos concuerda con los resultados de un estudio reciente sobre la ostra *C. gigas*, que considera a los granulocitos como los principales hemocitos inmunocompetentes (Wang *et al.*, 2017). Algunas de las proteínas identificadas en granulocitos participan en la respuesta inflamatoria; uno de los problemas letales asociados a la bonamiosis de la ostra plana es la respuesta inflamatoria excesiva que conduce a la destrucción de la arquitectura normal de muchos órganos (Abollo & Villalba, 2012). La mayor facilidad para que *B. ostreae* se multiplique en hialinocitos que en granulocitos (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a) y una menor capacidad de los hialinocitos para regular la respuesta inflamatoria podrían contribuir a la proliferación de este parásito en la ostra y las consecuencias nefastas de esta infección para el hoppedador. Por otro lado, el hecho de que ambos tipos hemocitarios expresen proteínas implicadas de manera diferente en la transducción de señales refuerza la idea de que granulocitos e hialinocitos tengan funciones distintas.



#### 4.4.2 Proteínas identificadas implicadas en apoptosis

La apoptosis es un proceso altamente organizado desarrollado en muchos organismos y desempeña un papel crucial en diversos procesos biológicos como la embriogénesis, la homeostasis y particularmente la defensa contra factores de estrés incluyendo patógenos al eliminar las células infectadas (Elmore, 2007); se requiere un control adecuado de los mecanismos de apoptosis para mantener la homeostasis celular durante la respuesta inmune (Wang *et al.*, 2016). En nuestro estudio se han identificado 9 proteínas implicadas en apoptosis, 8 correspondientes a marcas proteicas exclusivas de granulocitos y una correspondiente a una marca exclusiva de hialinocitos.

Una de las marcas proteicas exclusivas de granulocitos se identificó como glutatión S-transferasa 3 (GTS3). Las glutatión S-transferasas (GTS) son una superfamilia de enzimas ubicuas implicadas en muchas funciones fisiológicas, como detoxificación, transporte intracelular, biosíntesis de hormonas y protección contra estrés oxidativo (Blanchette *et al.*, 2007; Frova, 2006; Hayes *et al.*, 2005). Además GTS está relacionada con procesos de apoptosis (Circu & Yee Aw, 2008; Raza & John, 2006). En el apartado siguiente se tratará otra de las implicaciones relevantes de esta proteína en la respuesta inmune, a través de los procesos redox.

Otra de las marcas exclusivas de granulocitos correspondió a la N-acetilactosaminida  $\beta$ -1,6-N-acetilglucosaminil transferasa (GlcNAcT). Esta enzima, también es conocida como N-acetilglucosaminiltransferasa; pertenece a la familia de las glicosiltransferasas, específicamente hexosiltransferasas (Van Den Eijnden *et al.*, 1983). Puede catalizar la síntesis de hidratos de carbono y complejos tales como N-glicanos que son esenciales para la síntesis del transportador de glucosa y la producción de citoquinas (Brockhausen *et al.*, 1989; Taguchi *et al.*, 2000). La expresión de GlcNAcT se ha visto aumentada significativamente en hemocitos de vieiras *Chlamys farreri* tras una infección bacteriana, este incremento



activa la capacidad de gluconeogénesis y la producción de citoquinas relacionadas con el sistema inmune (X. Wang *et al.*, 2014).

El Factor de mortalidad 4 (Fragmento) (MORF4) se identificó en una marca exclusiva de granulocitos. El MORF4 es una proteína relacionada con senescencia, regulación de la proliferación celular, apoptosis, reparación del ADN y transcripción (Bertram *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2010). El MORF4 está entre las proteínas con una expresión que varía en invertebrados marinos bajo condiciones de estrés (Wiacek *et al.*, 2013) y por infección vírica (Fraga *et al.*, 2015). MORF4 también se ha identificado en ostras *C. gigas* asociado a funciones reproductivas (Sussarellu *et al.*, 2015).

Además, algunas de las proteínas identificadas en marcas proteicas exclusivas de granulocitos que se han tratado en el apartado previo por su implicación en vías de señalización, también están implicadas en apoptosis, en concreto UBE2W, TRIM38, ASB-13, CNKSR2 y EF1- $\alpha$ . La enzima UBE2W está implicada en apoptosis y, como tal, en la respuesta inmune antiviral (Jiang *et al.*, 2010; Pertel *et al.*, 2011; Tokumoto *et al.*, 2011). La expresión del gen E2W de *C. virginica* se ve modificada por el protozoo *P. marinus* (Wang *et al.*, 2010) pues, al tratarse de un parásito intracelular que se divide dentro del propio hemocito de la ostra, inhibiendo la apoptosis de la célula hospedadora, *P. marinus* mantiene el ambiente intracelular idóneo para su proliferación (Sunila & LaBanca, 2003). En *C. gigas* infectada por el virus OsHV-1 se ha observado que la expresión una enzima UBE varía como consecuencia a la infección vírica (Du *et al.*, 2013). La implicación de proteínas que contienen TRIM en apoptosis está bien documentada (McNab *et al.*, 2011). SOCS, que forma parte de ASB-13, es un importante regulador de citoquinas (Yoshimura *et al.*, 2007), diversas citoquinas están relacionadas con apoptosis (Ottaviani *et al.*, 1997, 2004; Barcia & Ramos-Martinez, 2008; Guo & Ford, 2016), la interleucina 17 (IL-17) entre otras (Aggarwal, 2003). En *C. gigas* los niveles de expresión de la IL-17 son mucho mayores en granulocitos que en hialinocitos (Wang *et al.*, 2017). El potenciador de conector supresor de quinasa de Ras (CNKSR), es capaz de inhibir apoptosis mediante la protección contra la producción de especies

reactivos de oxígeno y agentes de daño al ADN (X. Wang *et al.*, 2008). EF1- $\alpha$  participa en apoptosis (Gangwani *et al.*, 1998; Lamberti *et al.*, 2004); su expresión varía en almejas *Mercenaria mercenaria* en respuesta al parásito QPX (Perrigault *et al.*, 2009), en *C. gigas* por la infección del virus OsHV-1 (Corporeau *et al.*, 2014; Renault *et al.*, 2011) y en *O. edulis* afectada por bonamiosis (Martín-Gómez *et al.*, 2012).

Por otro lado, una proteína identificada en una marca proteica exclusiva de hialinocitos que se ha abordado en el apartado previo por su implicación en vías de señalización, también está implicada en apoptosis, en concreto la proteína p53 que contiene repeticiones de anquirina. La proteína p53 está implicada en control del ciclo celular, unión al ADN, activación y represión transcripcional y apoptosis (Royds & Iacopetta, 2006). Además está relacionada con el sistema inmune y es una proteína típica de respuesta al estrés en bivalvos (Götze *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016). La p53 está claramente implicada en la apoptosis de moluscos (Kiss, 2010; Sokolova, 2009). En *C. gigas* se ha identificado un miembro la familia p53 (Farcy *et al.*, 2008). La proteína p53 presenta una expresión diferencial en berberechos afectados por neoplasia diseminada (Díaz *et al.*, 2010) y en almejas *M. mercenaria* infectadas por el parásito QXP (Wang *et al.*, 2016). La expresión de p53 disminuye en orejas de mar expuestas a contaminantes como metales y CO<sub>2</sub> (Götze *et al.*, 2014).

En nuestro estudio se ha identificado un número mayor de proteínas implicadas en apoptosis en los granulocitos de ostra plana que en los hialinocitos; lo que es coherente con estudios previos realizados en otras especies de ostras, en los que se ha demostrado un nivel apoptótico diferente entre los tipos celulares, siendo mayor en granulocitos que en hialinocitos (Goedken *et al.*, 2005; Sunila & LaBanca, 2003). Existen estudios previos donde se han observado diferencias funcionales entre los tipos hemocitarios a la hora de eliminar partículas extrañas o invasoras (Wikfors & Alix, 2014), es posible que en dichos procesos de eliminación participen proteínas implicadas en procesos apoptóticos.

#### 4.4.3 Proteínas identificadas implicadas en procesos redox

El aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), conocido como "estallido respiratorio", tiene como objetivo la degradación de microorganismos invasores (Bachère *et al.*, 1991; Comesaña *et al.*, 2012). Las ROS actúan como potentes efectores inmunológicos y muestran un amplio espectro de toxicidad siendo cruciales en la defensa del hospedador y en el buen funcionamiento de los hemocitos. En nuestro estudio se identificaron 7 proteínas implicadas en apoptosis, 2 correspondientes a marcas proteicas exclusivas de granulocitos y 5 correspondientes a marcas exclusivas de hialinocitos.

Una de las marcas proteicas exclusivas de granulocitos correspondió a NADH deshidrogenasa subunidad 5. NADH deshidrogenasa o complejo I, es el punto de entrada principal de los electrones a la cadena respiratoria. El estado metabólico de la cadena respiratoria mitocondrial es uno de los parámetros más importantes y sensibles de salud (Bresler *et al.*, 2003). Se trata de una de las mayores fuentes celulares de energía y de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Raha *et al.*, 2000), de manera que NADH deshidrogenasa subunidad 5 está implicada en metabolismo energético y estrés oxidativo. El parásito *P. olseni* reduce la expresión de los genes NADH deshidrogenasa subunidad 5 de *R. decussatus* (Prado-Alvarez *et al.*, 2009a) probablemente para limitar la capacidad de los hemocitos de la almeja de producir ROS. La especie congénere *P. marinus* también modifica la expresión de las enzimas NADH deshidrogenasa subunidad 5 de la cadena respiratoria de *C. gigas* (Tanguy *et al.*, 2004). La NADH deshidrogenasa se encuentra sobrepresada en *M. mercenaria* parasitada por QPX (Perrigault *et al.*, 2009). La expresión de la NADH deshidrogenasa de *O. edulis* se encuentra alterada en respuesta a bonamiosis y a neoplasia diseminada (Martín-Gómez *et al.*, 2013, 2012).

Otra marca proteica exclusiva de granulocitos se identificó como glutatión S-transferasa 3 (GTS3), proteína que se ha tratado en el apartado previo por su implicación en procesos de apoptosis. La

glutación S-transferasa (GTS) se encuentra entre los mayores detoxificantes de xenobióticos (Blanchette *et al.*, 2007) y están relacionadas con la reducción de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo así esenciales para la protección celular contra productos del daño oxidativo y el metabolismo de xenobióticos (Martins *et al.*, 2014). Es común que bajo condiciones de estrés los niveles de ROS aumenten drásticamente, lo que podría resultar en un daño significativo de las estructuras celulares; las GSTs están implicadas en la detoxificación de compuestos tóxicos de origen endógeno y exógeno durante la respuesta inmune (Brophy & Pritchard, 1992) y juegan un papel importante en la defensa antioxidante, pudiendo reflejar la extensión del daño oxidativo (Song *et al.*, 2010; L. Zhang *et al.*, 2012). La actividad de GST se ha utilizado como biomarcador de contaminación en organismos acuáticos (Myrnes & Nilsen, 2007). Se ha observado un aumento en la expresión de la proteína GTS tras infección bacteriana en diversos bivalvos como *C. farreri*, *M. galloprovincialis* y *C. virginica* (Huan *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2013; McDowell *et al.*, 2014; Z. Sun *et al.*, 2014b). En los hemocitos de *O. edulis* la expresión del GST aumenta como consecuencia del enfrentamiento al parásito *B. ostreae* (Martín-Gómez *et al.*, 2012; Morga *et al.*, 2011b). En la almeja *R. philippinarum* el gen GST se expresa en individuos parasitados por *P. olseni* (Kang *et al.*, 2006), lo mismo ocurre en *C. virginica* infectada por *P. marinus* (Tanguy *et al.*, 2004).

Dos marcas proteicas exclusivas de hialinocitos se identificaron como lacasa 1 y lacasa 24. Las fenoloxidasas (POs), enzimas a las que pertenecen las lacasas, son una familia de proteínas asociadas a cobre, ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y animales (Chase *et al.*, 2000). Se trata de enzimas cruciales en la melanización; la producción de melanina comienza con la oxidación de fenoles y la reducción de  $O_2$  a  $H_2O_2$ . Esta reacción es catalizada por POs y produce quinonas que son polarizadas hacia la formación de melanina (Rodríguez-Lopez *et al.*, 1992). Concretamente las lacasas oxidan los difenoles en o-quinonas y p-difenoles en p-quinonas (Le Bris *et al.*, 2013), dichos compuestos se oxidan a continuación en melanina; tanto la melanina como los intermedios son sustancias tóxicas con

propiedades antifúngicas, antibacterianas y antivirales (Cerenius *et al.*, 2008; Söderhäll & Cerenius, 1998). Entre las POs se encuentran las lacasas cuya función está implicada en inmunidad, patogenicidad y morfogénesis (Mayer & Staples, 2002). Actividad PO de tipo lacasa implicada en la defensa inmune de bivalvos se ha descrito en diversas ostras; en *C. gigas* se han observado lacasas con actividad antibacteriana (Luna-acosta *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015), en *O. edulis* genes lacasa presentan una variación de su expresión en respuesta a bonamiosis (Martín-Gómez *et al.*, 2012) y asociada a neoplasia diseminada (Martín-Gómez *et al.*, 2013). Las enzimas POs participan en muchas respuestas de defensa celular, tales como reconocimiento de lo propio y no propio, fagocitosis y encapsulación (Asokan *et al.*, 1997; Söderhäll & Cerenius, 1998). Las lacasas son oxidasas que parecen tener un papel fundamental en la inmunidad innata de bivalvos, constituyendo una respuesta contra la infección de patógenos en ostras (Zhang *et al.*, 2015).

Una marca proteica exclusiva de hialinocitos correspondió a una proteína similar a transcetolasa 2 (TKT2). La transcetolasa (TKT) es una proteína implicada en el metabolismo de los carbohidratos, enzima importante en la vía de las pentosas fosfato (PPP), que es responsable de la transducción de energía y la síntesis de ácidos nucleicos (Kling *et al.*, 2008). Además tiene un papel relevante en la tolerancia al estrés oxidativo (Campos *et al.*, 2012; Dheilly *et al.*, 2013; Go & Jones, 2008) y la capacidad de eliminar ROS del citoplasma (Tomanek, 2012). La expresión de la proteína TKT varía bajo condiciones de estrés en diversos bivalvos (Tomanek, 2012; Wu *et al.*, 2010). Por ejemplo, en ostras el gen de la TKT2 presenta una expresión condicionada por diferentes patógenos; es el caso de la infección por el virus OsHV-1 en *C. gigas* (Renault *et al.*, 2011) y por *P. marinus* en *C. virginica* (Wang *et al.*, 2010).

Otra marca proteica exclusiva de hialinocitos fue identificada como metionina adenosiltransferasa. La enzima metionina adenosiltransferasa o S-adenosilmetionina sintasa (SAM-S) cataliza la biosíntesis de S-adenosilmetionina a partir de metionina y ATP. Existe evidencia de que SAM participa en variedad de mecanismos celulares

como: reparación de membranas lipídicas mediante la síntesis de fosfolípidos (Y. Li *et al.*, 2007), regulación de la expresión de genes en respuesta al estrés a través de la metilación de histonas y ADN (Szegegi *et al.*, 2008), regulación de la función de las HSPs por metilación (Markham & Pajares, 2009) e incremento de la relación de glutatión reducida/oxidada potenciando la actividad de superóxido dismutasa (SOD) (Cavallaro *et al.*, 2010). SAM-S parece estar involucrada en el proceso de desintoxicación celular (Matrangolo *et al.*, 2013) y se ha relacionado con la metilación y el metabolismo xenobiótico (Marcos & Angel, 2015). SAM-S es uno de los genes de *C. gigas* cuya expresión varía bajo condiciones de estrés (Sussarellu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015).

Otra marca proteica exclusiva de hialinocitos correspondió a piridoxina-5'-fosfato oxidasa isoforma X5 (PNPO). La vitamina B6 o fosfato de piridoxal (PLP), es conocida como un cofactor esencial para numerosas reacciones enzimáticas (John, 1995). Además, las vitaminas B6 son excelentes antioxidantes particularmente activos en la extinción de oxígeno singlete y anión superóxido (Ehrenshaft *et al.*, 1999; Jain & Lim, 2001; Osmani *et al.*, 1999). La vitamina B6 se ha identificado entre las moléculas implicadas en la inmunidad de moluscos (Lockyer *et al.*, 2007). La PNPO cataliza la biosíntesis de vitamina B6 mediante la oxidación de PNP (piridoxina 5 fosfato) a PLP (piridoxal 5-fosfato) (di Salvo *et al.*, 2003).

Estudios previos concuerdan en que existen diferencias en diversos procesos redox entre los tipos hemocitarios de bivalvos. Si bien se considera que la actividad oxidativa a través de la producción de ROS es más elevada en granulocitos que en hialinocitos (Donaghy *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2013; Lambert *et al.*, 2007, 2003; Wang *et al.*, 2017), existen estudios donde se ha observado mayor producción de ROS en hialinocitos (Evariste *et al.*, 2016); incluso se cree que ambos hemocitos con capaces de producir ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) distintos (Hong *et al.*, 2013). Nuestros resultados muestran diferencias en la expresión de proteínas relacionadas con procesos de oxidación-reducción entre los tipos hemocitarios; se ha propuesto que hialinocitos y granulocitos utilizan mecanismos



diferentes para la eliminación de partículas extrañas y patógenos (Wikfors & Alix, 2014). En concreto, la vía de la NO-sintasa parece ser más dominante en hialinocitos, mientras que la NADPH-oxidasa es más activa en granulocitos (Lambert *et al.*, 2007), sugiriendo que las dos subpoblaciones de hemocitos poseen diferentes capacidades de respuesta mediante ROS/RNS. Las proteínas identificadas en el presente estudio podrían estar relacionadas con dichas diferencias. Cabe destacar el mayor número de proteínas identificadas en hialinocitos con propiedades detoxificantes; es posible que dentro de las diferencias existentes entre los tipos hemocitarios, los hialinocitos sean más activos que los granulocitos en la detoxificación de ROS.

#### 4.4.4 Proteínas identificadas implicadas en citoesqueleto

El citoesqueleto juega un papel crucial en la respuesta inmune (Wickramarachchi *et al.*, 2010), participando en la eliminación de patógenos (G. Chen *et al.*, 2011). De las proteínas identificadas en nuestro estudio relacionadas con citoesqueleto, dos proteínas correspondieron a sendas marcas exclusivas de granulocitos, otra a una marca exclusiva de hialinocitos y otra correspondió a isoformas en marcas exclusivas de granulocitos e hialinocitos.

El factor de elongación 1  $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ), detectado en una marca proteica exclusiva de granulocitos, ya se ha tratado con más detalle en las secciones previas de vías de señalización y de apoptosis. EF1- $\alpha$  también participa en la organización del citoesqueleto (Gangwani *et al.*, 1998; Lamberti *et al.*, 2004). Asimismo, la proteína HSP90, que se identificó en una marca proteica exclusiva de granulocitos y se ha tratado previamente en la sección de vías de señalización, también se encuentra asociada con proteínas del citoesqueleto, tales como actina y tubulina (Czar *et al.*, 1996; Garnier *et al.*, 1998; Liang & MacRae, 1997). HSP90 $\alpha$  1 es un factor de transcripción que puede interactuar con el citoesqueleto (Sanchez, 2012).

En el caso de marcas exclusivas de hialinocitos, la flotillina 2, ya tratada previamente en la sección de vía de señalización, también está



asociada al citoesqueleto pues las flotillinas están implicadas en gran variedad de procesos celulares en los que interviene el citoesqueleto, como adhesión celular, endocitosis, fagocitosis y tráfico vesicular (Bared, 2004; Bickel *et al.*, 1997; Dremina *et al.*, 2005; Hoehne *et al.*, 2005; Langhorst *et al.*, 2007; Rajendran *et al.*, 2003).

Nuestros resultados muestran diferencias entre granulocitos e hialinocitos también en proteínas con papeles relacionados con el citoesqueleto. Previamente se han publicado variaciones relativas al citoesqueleto entre los tipos hemocitarios de bivalvos. Se han encontrado diferencias en la locomoción entre los tipos celulares de ostra, mientras los granulocitos tienen un movimiento ameboidal y direccional, los hialinocitos a menudo se adhieren a un sustrato y se propagan multidireccionalmente (Kuchel *et al.*, 2010). Por otro lado, los granulocitos se consideran el tipo celular con mayor actividad fagocítica (Cajaraville & Pal, 1995; Fisher, 1988; López *et al.*, 1997c; Chu, 2000; Kuchel *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2013); llegando a considerarlos como el único tipo hemocitario capaz de fagocitar (Wikfors & Alix, 2014). Los granulocitos son también el tipo celular predominante implicado en reacciones de encapsulación en ostras *Saccostrea glomerata* (Aladaileh *et al.*, 2007b). Otros estudios han demostrado que ciertos tipos celulares preferentemente fagocitan diferentes células diana. Así, los granulocitos de *C. gigas* engullen más levaduras y bacterias que los hialinocitos, mientras que los hialinocitos fagocitan más perlas de látex (Terahara *et al.*, 2006). Por tanto el índice fagocítico de hialinocitos parece estar relacionado con la naturaleza de la materia extraña, lo que sugiere diferencias funcionales entre tipos hemocitarios y una fagocitosis basada en receptores de iniciación (López *et al.*, 1997a; Terahara *et al.*, 2006). Además, las propiedades de adhesión son extremadamente importantes en el sistema inmune y los hialinocitos muestran notable adhesión y agregación (Travers *et al.*, 2008). Por otro lado, diferentes vías de degradación podrían estar relacionadas con diferentes capacidades fagocíticas celulares dependiendo de la naturaleza de las partículas, con el objetivo de optimizar la eficiencia de degradación (Evariste *et al.*, 2016). Las diferencias encontradas en la expresión proteica entre los tipos hemocitarios podrían estar relacionadas con las

variaciones funcionales del citoesqueleto entre granulocitos e hialinocitos.

Cabe destacar el caso de la actina; en nuestros resultados esta proteína se ha identificado expresada en ambos tipos celulares en diversas marcas proteicas. La actina es la proteína más abundante en la mayoría de células eucarióticas, incluidos los hemocitos (G. Chen *et al.*, 2011). Se trata de una proteína contráctil, globular bien conservada que está implicada en diversas funciones relacionadas con el citoesqueleto, como morfología, división celular, movimiento de orgánulos y vesículas, señalización celular, locomoción, fagocitosis, endocitosis y exocitosis (Kabsch & Vandekerckhove, 1992; May & Machesky, 2001; Rubenstein, 1990), todas ellas de gran importancia en la respuesta inmune. Mientras en granulocitos una sola marca proteica exclusiva de este tipo se ha identificado como actina, varias marcas proteicas exclusivas de hialinocitos, con puntos isoeléctricos (pIs) y pesos moleculares (PMs) diferentes, se han identificado como actina. Por tanto, en los hialinocitos de *Ostrea edulis* existen varios tipos de actinas o actinas con diferentes modificaciones postranscripcionales. Dentro de los moluscos se han diferenciado 2 tipos distintos de actina, una muscular y otra citoplasmática (Carlini *et al.*, 2000); en los hemocitos de ostra se encuentra la actina citoplasmática (Z. Wang *et al.*, 2008), pero las secuencias genómicas de actina pueden representar varias isoformas (Adema, 2002). La expresión de diversas actinas en varios invertebrados marinos, entre ellos en bivalvos, se había observado previamente (G. Chen *et al.*, 2011; J. Zhang *et al.*, 2010). Modificaciones postranscripcionales de actina como fosforilación, glicosilación, acetilación, ubiquitilación y fragmentación entre otras, están estrechamente relacionadas con su función proteica (Abe *et al.*, 2000; Papakonstanti & Stournaras, 2002; Vandermoere *et al.*, 2007). Por tanto la existencia de varias isoformas de actina sugiere que estas proteínas tienen funciones complejas en los hemocitos de la ostra plana. El hecho de que en nuestros resultados la actina aparezca como una proteína expresada en puntos diversos del patrón proteico de los tipos celulares, sugiere que aunque la proteína esté presente en ambos tipos hemocitarios es posible que existan ciertas modificaciones postranscripcionales que conlleven funciones

celulares concretas y que varíen entre granulocitos e hialinocitos, como las mencionadas previamente en fagocitosis y locomoción

#### **4.4.5 Proteínas identificadas implicadas en digestión**

Dos proteínas identificadas correspondientes a sendas marcas proteicas exclusivas de granulocitos están implicadas en digestión.

La  $\alpha$ -manosidasa lisosomal es una glicosidasa presente en los lisosomas encargada de la digestión y la eliminación de partículas extrañas (Cheng, 1992; Gestal *et al.*, 2008). Enzimas lisosomales tienen funciones relacionadas con degradación, metabolismo y respuesta inmune (Kumar & Bhamidimarri, 2015) y se consideran importantes elementos del sistema defensivo de moluscos para degradar patógenos fagocitados o para degradar patógenos extracelularmente mediante la liberación de la enzima (Cajaraville *et al.*, 1995; Cheng, 1983, 1981; Cheng & Rodrick, 1975).

La proteína 2 relacionada con lipasa pancreática (PLRP2) es una enzima implicada en el metabolismo lipídico que participa en digestión; además puede estar implicada en citotoxicidad y contribuir en propiedades antimicrobianas (Lowe, 2000). Los genes de proteínas relacionadas con la lipasa pancreática se han observado expresados de manera diferencial en respuesta al estrés en *C. gigas* (Sussarellu *et al.*, 2010). En la misma especie se ha demostrado una mayor movilización de reservas de energía asociadas a la proteína relacionada con la lipasa pancreática (Clark *et al.*, 2013). Además es el gen que codifica a PLRP2 es uno de los genes cuya expresión varía entre ostras *C. gigas* resistentes y susceptibles al fenómeno de la mortalidad estival (Fleury & Huvet, 2012).

La detección de ambas proteínas relacionadas con digestión en los granulocitos pero no en hialinocitos concuerda con estudios previos que indican una mayor cantidad de enzimas lisosomales presentes en los granulocitos que en los hialinocitos (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a; López *et al.*, 1997a; Pipe *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2017). Como se ha mencionado repetidamente, los granulocitos

muestran mayor capacidad fagocítica y las partículas fagocitadas son digeridas en su interior, por lo que necesitan una batería amplia de enzimas digestivas. Es comúnmente asumida la hipótesis de que los granulocitos son el principal tipo hemocitario implicado en la defensa inmune de bivalvos (Carballal *et al.*, 1997c; Donaghy & Volety, 2011; Hégaret *et al.*, 2003; Terahara *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta que PLRP2 participa en digestión, citotoxicidad y contribuye en propiedades antimicrobianas, es posible que PLRP2 contribuya a la mayor implicación de los granulocitos en la defensa del organismo.

#### **4.4.6. Proteínas identificadas implicadas en otras funciones**

Una marca proteica exclusiva de granulocitos se identificó como la proteína bifuncional BirA, una proteína que actúa como regulador transcripcional y como enzima (Brennan *et al.*, 1989). El dominio N-terminal de BirA es necesario tanto para la regulación de la transcripción de la síntesis de biotina, como para la actividad ligasa de la proteína biotina (Chakravarty & Cronan, 2013). La biotina (vitamina H o B<sub>7</sub>) es una coenzima esencial para todas las formas de vida y tiene actividad biológica sólo cuando se une covalentemente a ciertas enzimas metabólicas (Chapman-Smith & Cronan, 1999). La proteína bifuncional BirA, pertenece a la familia de los reguladores transcripcionales (Chakravarty & Cronan, 2013), y parece estar relacionada con la defensa del organismo, ya que el metabolismo de la biotina se ha identificado implicada en la inmunidad de moluscos (Lockyer *et al.*, 2007). Además, enzimas relacionadas con la biotina se han identificado en almejas con una expresión que varía como consecuencia de infecciones bacterianas (Moreira *et al.*, 2014).

Otra de las marcas exclusivas de granulocitos correspondió a la proteína PSF2 del complejo GINS de replicación de ADN. El complejo GINS es esencial para los procesos de iniciación y elongación de la replicación del ADN, dicho complejo está formado por 4 subunidades, una de ellas es la proteína PSF2, todas necesarias para llevar a cabo su función (Cohen *et al.* 2009). Pese a que no hay mucha bibliografía de esta proteína en moluscos, se ha estudiado que

la expresión de diversas subunidades del complejo GINS, entre ellas PSF2, varía bajo condiciones de acidificación en invertebrados marinos (Todgham & Hofmann 2009; Wäge *et al.* 2016).

La S13 proteína ribosomal 40S se identificó en una marca exclusiva de granulocitos. La iniciación de la síntesis de proteínas en eucariotas es un proceso complejo que requiere ARNm, subunidades ribosomales 40S y 60S, iniciador cargado ARNt, ATP, GTP, y varios factores de iniciación (Li *et al.* 1999). Subunidades de proteínas ribosomales 40S se han identificado con una expresión condicionada por infección bacteriana en almejas (Araya *et al.* 2010; Moreira *et al.* 2014), y bajo condiciones de estrés en ostras (Tanguy *et al.* 2005; Thompson *et al.* 2012). La expresión de diversos genes de proteínas ribosomales varía en *O. edulis* infectada por bonamiosis y por neoplasia diseminada (Martín-Gómez *et al.* 2012; Martín-Gómez *et al.* 2013). Se ha observado que la distribución de enzimas hidrolíticas entre granulocitos e hialinocitos en la almeja japonesa da lugar a diferentes respuestas fisiológicas e inmunológicas (Cima *et al.* 2000). Se demostró que sólo los granulocitos presentan  $\beta$ -glucuronidasa, esterasa ácida y la arilsulfatasa en almejas *R. philippinarum* (Cima *et al.* 2000). En mejillones, se ha observado la presencia de fosfatasa ácida, glucuronidasa, N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa, arilsulfatasa, esterasa y peroxidasa sólo en granulocitos (Moore & Lowe 1977; Carballal *et al.* 1997). En almejas, se han observado estererasas no específicas, fosfatasas ácidas y alcalinas en los granulocitos de *Mya arenaria* (Huffman & Tripp 1982) y en *Tridacna crocea*, los hemocitos granulares eosinófilos son el único tipo de célula que presenta actividad fosfatasa ácida (Nakayama *et al.* 1997). Las diferentes enzimas expresadas conllevan funciones diferentes. La proteína S13 ribosomal 40S podría estar involucrada en las diferencias en la expresión proteica entre granulocitos e hialinocitos.

En hialinocitos también se ha identificado la proteína similar a cemento (SGMP), se trata de una proteína rica en glicina que se ha documentado previamente en ostras (Marie *et al.* 2012; Endo *et al.* 2013; Liu *et al.* 2015). Los hemocitos de moluscos están implicados en diversos procesos fisiológicos, entre otros en la producción de la

concha (Cheng 1996; Chu 2000). SGMP es uno de los genes implicados en la biomineralización de la concha en ostras *P. fucata* (Endo *et al.* 2013). La expresión de SGMP en hialinocitos sugiere que pueden existir diferencias en los procesos de formación de la concha entre los hemocitos de *O. edulis* donde SGMP podría estar implicada.







## 5 COMPARACIÓN DEL PROTEOMA DE GRANULOCITOS E HALINOCITOS DE *Ostrea edulis* MEDIANTE EL PROCEDIMIENTO DE “SHOTGUN”

### 5.1 INTRODUCCIÓN

#### 5.1.1 Técnicas 2-DE y "Shotgun": Estudios proteómicos complementarios

Como se ha explicado detalladamente en la introducción general, "Shotgun" es una técnica proteómica conceptualmente distinta que implica utilizar mezclas complejas de proteínas o incluso todo un proteoma, y digerir todas las proteínas a péptidos. La mezcla resultante de péptidos se analiza a continuación, utilizando cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas (MS); en nuestro estudio la espectrometría de masas se realizó con una fuente de ionización MALDI (Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz). Los datos de los fragmentos peptídicos obtenidos mediante LC-MALDI-MS se comparan con bases de datos de secuencias para determinar las proteínas presentes en la muestra (Wilkins & Appel, 2007). LC-MALDI es una técnica muy flexible que se puede adaptar a una amplia gama de flujos de trabajo diferentes (Mueller *et al.*, 2007) y que permite obtener datos de alta calidad (Fernández-puente *et al.*, 2014). La técnica proteómica LC-MALDI se puede aplicar al estudio de cualquier tipo de proteoma como una

alternativa y /o complemento al análisis de proteoma basado en 2-DE (Maccarrone *et al.*, 2010).

La creciente popularidad del fraccionamiento basado en la cromatografía es consecuencia de su capacidad para superar algunas de las limitaciones de los métodos basados en la 2-DE, permitiendo de este modo el estudio de ciertas proteínas difíciles de abordar mediante 2-DE (Peng & Gygi 2001; Washburn *et al.* 2001). Uno de los principales inconvenientes de la proteómica basada en 2-DE es la posibilidad de resolver sólo unos pocos miles de proteínas en el mejor de los casos y no más de unos pocos cientos en el formato de los mapas 2-DE (Mi *et al.*, 2005). En particular, una 2-DE típica puede visualizar sólo el 30-50% de todo el proteoma, dependiendo del tipo de tejido (Baggerman *et al.*, 2005), excluyendo proteínas de baja concentración o aquellas que no pueden ser separadas por 2-DE debido a sus propiedades físicoquímicas (pI, hidrofobicidad, peso molecular) (Gygi *et al.*, 2000). Una posible solución a este problema es la visualización de proteínas de baja abundancia mediante la adición de un paso de fraccionamiento adicional en la preparación de la muestra. Amelina *et al.* (2007) mostraron cómo la combinación de fraccionamiento subcelular simple con cromatografía líquida, junto con 2-DE en el bivalvo *M. edulis*, podría ser escalable a la automatización y, potencialmente, ser una técnica asequible para grandes campañas de monitoreo.

Los estudios 2-DE suelen llevar mucho tiempo, ser muy costosos e insensibles a proteínas de baja abundancia, además son incapaces de separar adecuadamente todo el proteoma de los bivalvos (restringiéndose a un rango de pH específico dependiendo de las tiras IPG que se utilicen) (Rabilloud, 2002). En los últimos años, los esfuerzos se han centrado en enfoques alternativos a la proteómica 2-DE, como la proteómica libre de gel donde se pueden analizar las proteínas y péptidos hidrófobos. En lugar de usar 2-DE, estos enfoques utilizan LC-MALDI/MS o LC-MS/MS multidimensional para separar e identificar péptidos obtenidos a partir de la digestión enzimática de un extracto de proteína entero. Estos acercamientos proteómicos "shotgun" tienen la limitación de identificar una proteína

basada en la secuencia de un solo (o algunos) péptidos resultantes de la digestión de dicha proteína por tripsina (Baggerman *et al.*, 2005). Por lo tanto, el uso exclusivo de la proteómica "shotgun" en bivalvos, aunque requiere un tiempo mucho más corto para los análisis no siempre puede discriminar entre isoformas o PMT importantes (Campos *et al.*, 2012). En estas circunstancias, la 2-DE puede aportar algunas ventajas mediante la entrega de un mapa de proteínas intactas donde las isoformas o PTMs pueden visualizarse fácilmente por desviaciones en el punto isoelectrico (pI) (por ejemplo fosforilación) o masa relativa (por ejemplo, glicosilación) (Görg *et al.*, 2004). Por tanto, el uso de 2-DE y "shotgun" pueden ser enfoques complementarios en estudios proteómicos, entre otros en la proteómica de bivalvos (Amelina *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2006; Kubota *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2006, 2004).

### 5.1.2 Uso de proteómica "shotgun" en moluscos

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas o proteómica "shotgun" es un poderoso enfoque no sesgado en la investigación de las respuestas biológicas, que ofrece una visión de los mecanismos subyacentes que podrían conducir a efectos fenotípicos (Timmins-Schiffman *et al.*, 2014). El uso de la proteómica "shotgun" permite identificar un mayor número de proteínas rápidamente a partir de una sola muestra que con el uso de electroforesis 2D, proporcionando una imagen metabólica más completa de la función celular y la fisiología (Schiffman *et al.*, 2013).

En invertebrados marinos este método se ha utilizado para estudiar la expresión proteica de langostinos infectados por el virus (WSSV) (Wu *et al.*, 2007) y para explorar la respuesta proteómica de los coelomocitos frente al desafío inmune en dos especies de erizos (Dheilly *et al.*, 2013, 2012). En bivalvos la técnica de "shotgun" se ha utilizado para recopilar información de las funciones de la hemolinfa y los elementos implicados en la inmunidad innata de *M. edulis* (Campos *et al.*, 2015). En la misma especie se ha investigado la respuesta del mejillón tras un largo periodo de exposición a baja

salinidad y contaminantes (Campos *et al.*, 2016). Recientemente, se ha realizado un estudio del método utilizado para evaluar los niveles de vitelogenina presentes en *M. galloprovincialis* (Sánchez-Marín *et al.*, 2017). Además se ha utilizado la técnica "shotgun" para estudiar el proteoma de la concha de varios bivalvos (Arivalagan *et al.*, 2017). En ostras se han realizado estudios "shotgun" para descubrir las respuestas proteómicas de hemocitos de *Saccostrea glomerata* a la contaminación por metales (Muralidharan *et al.*, 2012), para secuenciar el proteoma branquial de *C. gigas* (Schiffman *et al.*, 2013) y para revelar la respuesta fisiológica de *C. gigas* a la acidificación del océano (Timmins-Schiffman *et al.*, 2014). Además se ha utilizado para profundizar en el estudio del protozoo parásito de varios bivalvos, entre otros las ostras, *P. marinus* (Leibowitz *et al.*, 2017). Por tanto se ha demostrado la utilidad del uso de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en el estudio del sistema inmune y en organismos inferiores como las ostras.

### 5.1.3. Objetivos

Teniendo en cuenta la utilidad del procedimiento "shotgun" y los precedentes de su uso con moluscos, decidimos aplicar este procedimiento para profundizar en las diferencias funcionales entre los dos tipos fundamentales de hemocitos de *O. edulis*, granulocitos e hialinocitos, comparando los proteomas respectivos resultantes. Éste constituye el primer estudio del sistema inmunitario de esta especie realizado mediante "shotgun" y se plantea como un complemento al estudio proteómico con separación de proteínas de cada tipo hemocitario con electroforesis bidimensional, recogido en el apartado previo.

## 5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

En la comparación del proteoma de los tipos hemocitarios mediante LC-MALDI/MS, también se usaron ostras procedentes de Dinamarca para descartar la existencia de proteínas de *Bonamia* en las muestras de hemocitos. La observación de la morfología de los

hemocitos y la extracción proteica se realizaron exactamente como se describe en los apartados 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3, 4.2.4 y 4.2.5.

### 5.2.1 Preparación de muestras y digestión con tripsina

Para el análisis de LC-MALDI-MS se cuantificó la proteína (RC DC Protein Assay, BioRad Lab, CA) y se cargaron 200  $\mu$ g en un gel SDS-PAGE al 10%. El gel se dejó correr hasta que el frente entró 3 mm en el gel de resolución (Bonzon-Kulichenko *et al.*, 2011; Perez-Hernandez *et al.*, 2013). La banda proteica se visualizó con la tinción fluorescente Sypro-Ruby (Lonza, Suiza) y se sometió a digestión trípica manual en gel siguiendo un procedimiento estándar con ligeras modificaciones (Shevchenko *et al.*, 1996). La banda se lavó en agua ultrapura con MeOH al 50% (grado HPLC, Scharlau, Barcelona, España) y se deshidrató en acetonitrilo (ACN) (grado HPLC, Scharlau, Barcelona, España), seguido de reducción en gel con ditiotritol 10 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en bicarbonato de amonio 50 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (30 minutos a 56 °C) y se sometió a alquilación con 55 mM de yodoacetamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en bicarbonato de amonio 50 mM (20 min a temperatura ambiente en la oscuridad). Los trozos de gel se lavaron posteriormente con bicarbonato de amonio 50 mM en MeOH al 50% (grado HPLC, Scharlau, Barcelona, España) y se deshidrataron con ACN puro (grado HPLC, Scharlau, Barcelona, España). La digestión trípica se llevó a cabo mediante la adición de 6 ml de 20 ng/ml de tripsina modificada (Promega, CA, USA) en bicarbonato de amonio 20 mM, y los trozos de gel se dejaron 20 min sobre hielo para su rehidratación; esta digestión se llevó a cabo durante toda la noche a 37 °C. Los péptidos se extrajeron tres veces mediante 20 minutos de incubación en 40  $\mu$ l de acetonitrilo al 60% en HCOOH al 0,5%. Los extractos de péptidos resultantes se combinaron, se concentraron utilizando un SpeedVac y se almacenaron a -20°C.

La separación de las mezclas de péptidos resultantes de la digestión por tripsina se realizó mediante LC-MS/MS de fase inversa en nanoescala. El nanoLC Ultra 1D plus, (EKSigent, ABSciex Boston,

EEUU) se acopló a un observador MALDI (Eksigent, ABSciex). Las mezclas de péptidos se volvieron a disolver en ácido fórmico al 0,1%, ACN al 2% y se inyectaron en la columna de captura (columna ChromXP nanoLC Trap 350  $\mu$ m id x 0,5 mm, ChromXP C18 3  $\mu$ m 120 Å, ABSciex) a un flujo de 10  $\mu$ l/min (0,1% de ácido fórmico al 2% de ACN). Después de 15 minutos, los péptidos retenidos se separaron en una nanocolumna (columna ChromXP nanoLC 75  $\mu$ m id x 15 cm, ChromXP C18 3  $\mu$ m 120 Å, ABSciex) a un flujo de 300  $\mu$ l/min en una elución de gradiente lineal desde 95% de A (0,1% Ácido fórmico, 2% de ACN) hasta 60% de B (ACN al 90%, FA al 0,1%) durante 80 minutos, seguido de un aumento hasta un 95% de B en 5 min. Los péptidos de elución se mezclaron con una solución matriz, que constaba de 3 mg de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico ( $\alpha$ -CHCA) disuelto en 1 ml de ACN al 50% en ácido trifluoroacético al 0,1% y 10 fmol/ $\mu$ l de angiotensina (como estándar interno, Sigma) y fueron depositados sobre un inserto Opti-TOF LC/MALDI (ABSciex) con una velocidad de una marca proteica cada 12 segundos.

### **5.2.2 Análisis de espectrometría de masas e identificación proteica**

El análisis de espectrometría de masas, utilizando muestras triplicadas, se realizó utilizando un analizador 4800 MALDI-TOF/TOF (ABSciex). Los espectros MS se adquirieron en modo reflector de iones positivos con un láser Nd: YAG, de 355 nm de longitud de onda, con un promedio de 1000 disparos láser y usando al menos tres picos de autólisis de tripsina como calibración interna. Todos los espectros de MS/MS se realizaron seleccionando los precursores con una resolución relativa de 300 (FWHM) y supresión metastable. La identificación de péptidos y proteínas se realizó utilizando el programa Protein Pilot versión 4.0.80.85 (ABSciex) con Algoritmo Paragon. Los datos de MS/MS se registraron en la base de datos UniProt/Swiss-Prot de secuencias de proteínas (julio de 2014, Swiss-Prot, Ginebra, Suiza). Las búsquedas se limitaron a la taxonomía de Mollusca permitiendo carbamidometil cisteína como modificación fija y metionina oxidada como modificación variable.



## Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* mediante el procedimiento de “shotgun”

Tanto la tolerancia de la masa del precursor como la tolerancia MS/MS se fijaron en 30 ppm y 0.35 Da, respectivamente, permitiendo 1 sitio de escisión triptica perdido. Sólo las proteínas con un umbral mayor al 95% de confianza (> 1.3 puntuación no utilizada) se consideraron como candidatos positivos.

Debido a la pobre cobertura de proteínas y secuencias de ADN de la base de datos de *Ostrea edulis*, la mayoría de las proteínas fueron identificadas mediante secuenciación *de novo* y búsqueda de similitud BLAST siguiendo un procedimiento esbozado por Liska & Shevchenko 2003. Todos los espectros MS/MS para una muestra fueron secuenciados *de novo* utilizando el programa Pro BLAST 1.4 (Applied Biosystems) (Altschul *et al.*, 1997), y cada una de las secuencias candidatas para cada MS/MS se incluyó en una sola cadena de búsqueda de formato de texto. La cadena de búsqueda se sometió luego a la búsqueda de similitud de secuencias de MS BLAST usando una versión de servidor Paracel BLAST (Paracel, Pasadena, CA, EE.UU.), bajo los siguientes parámetros: i) modificaciones fijas: Cys como derivado S carbamidometilo; ii) tolerancia de masa: 0.3 Da; iii) umbral de valor E: 20; iv) matriz de puntuación: PAM30MS; v) algoritmo enzima: Tripsina. Se identificó la significación de identificación de proteínas mediante el algoritmo de puntuación MS BLAST. Adicionalmente, los patrones de fragmentación calculados a partir de las secuencias peptídicas asignadas se compararon con datos crudos de MS/MS usando enlaces proporcionados por el programa Pro BLAST. Sólo las proteínas que coincidieron con un mínimo de tres secuencias de péptidos con al menos 20 residuos de aminoácidos idénticos se incluyeron en la lista resultante, proporcionando criterios más estrictos para la identificación (Jorge *et al.*, 2005).

### 5.2.3 Búsqueda de proteínas homólogas y análisis GO

Para analizar todas las proteínas identificadas se utilizó el programa informático Blast2GO versión 4.1.7 para analizar todas las proteínas identificadas. Las secuencias de proteínas con función desconocida se anotaron con una búsqueda blast en la base de datos



NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica) utilizando el algoritmo blastp en el programa Blast2GO versión 4.1.7 y empleando un valor umbral e-value de  $1 \times 10^{-10}$ . Se usaron términos de ontología génica (GO) para agrupar las proteínas en las siguientes categorías: proceso biológico, componente celular y función molecular.

### 5.3 RESULTADOS

#### 5.3.1 Identificación proteica mediante Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MALDI/MS)

Tras la identificación proteica mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MALDI/MS) se han podido identificar 212 proteínas en granulocitos y 218 en hialinocitos (Tabla 1), a continuación se realizó una comparativa para seleccionar aquellas proteínas exclusivas de cada tipo hemocitario, con las que se realizó un análisis mediante el programa informático versión 4.1.7, descartando las proteínas hipotéticas.

**Tabla 1.** Proteínas identificadas en los tipos hemocitarios de *Ostrea edulis* mediante LC-MALDI/MS.

	Granulocitos	Hialinocitos
Proteínas totales	212	218
Proteínas exclusivas	114	112
Proteínas exclusivas con funciones inmunológicas	24	17

#### 5.3.2 Resultados del análisis GO

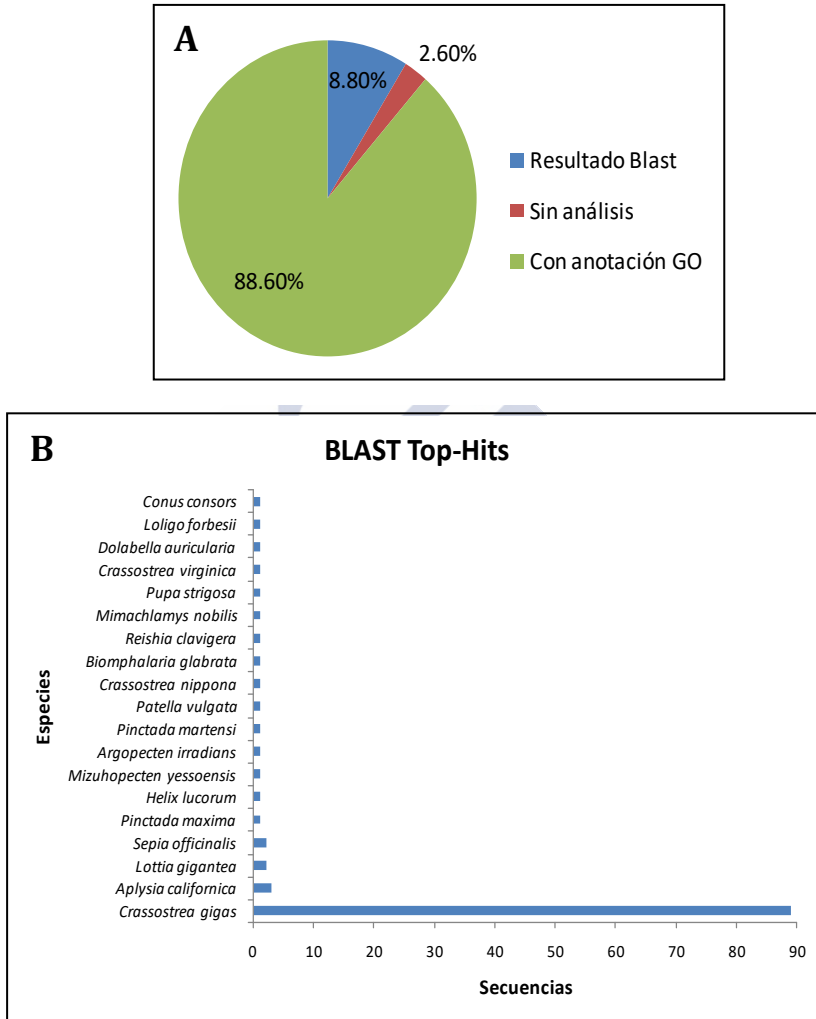
Con el objetivo de relacionar funciones respectivas a las proteínas desconocidas, se asignaron las anotaciones GO (ontología génica) a través de la búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos pública (nrNCBI) utilizando la herramienta Blast2GO. Tras un

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* mediante el procedimiento de “shotgun”

análisis de las 114 proteínas identificadas como exclusivas de **granulocitos** se anotaron mediante el programa Blast2GO el 88,60%; en un 2,60% de los casos no se encontraron resultados y en el 8,80% se obtuvo resultado en el Blast pero no se logró una anotación de las proteínas (Figura 1A).

El 78% de las proteínas identificadas (un total de 89) se encontraron entre las secuencias de *Crassostrea gigas*, las 22 proteínas restantes se encontraron en otras 18 especies de moluscos (Figura 1B). Este dato no es de extrañar ya que todas nuestras proteínas pertenecían a *O. edulis* y el único genoma de ostra completamente secuenciado es el de *C. gigas* (G. Zhang *et al.*, 2012).





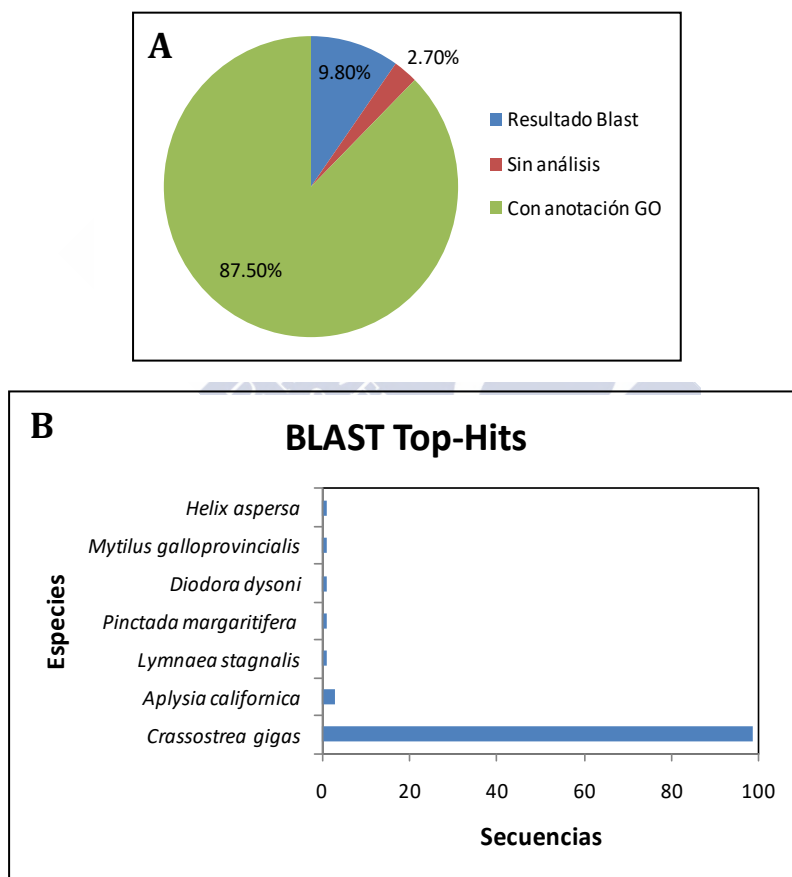
**Figura 1.** Información estadística sobre la búsqueda Blast y la anotación GO de las proteínas de **Granulocitos** utilizando la herramienta Blast2GO. Distribución de datos (A) y distribución de especies de mayor impacto (B).

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* mediante el procedimiento de “shotgun”

En **hialinocitos** se identificaron como exclusivas 112 proteínas; de las cuales el 87,50% se anotaron mediante Blast2GO, en un 2,70% no hubo análisis y en el 9,80% se obtuvo resultado en el Blast pero no se logró una anotación de las proteínas (Figura 2A).

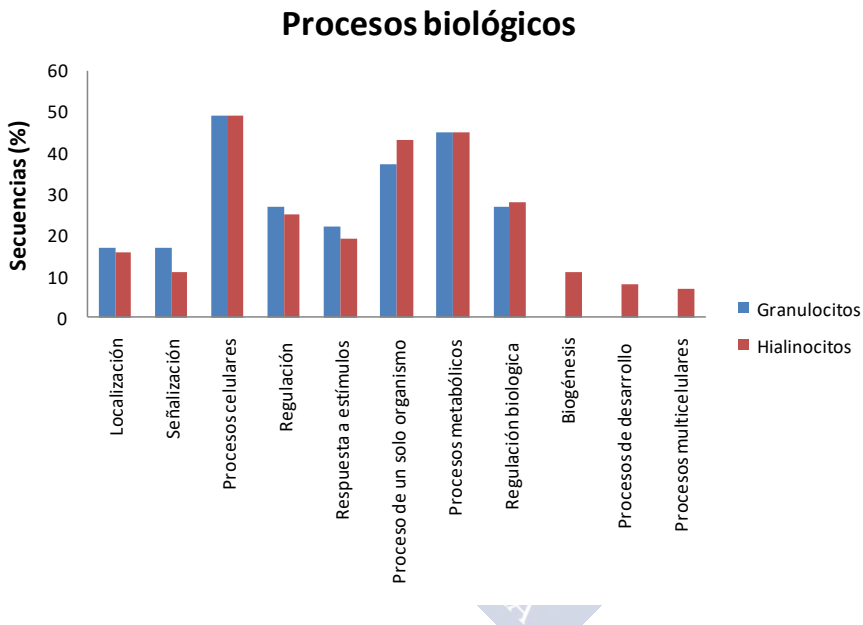
De la misma manera que ocurrió en granulocitos, la gran mayoría de las proteínas identificadas, un 88%, pertenecían a *C. gigas* (Figura 2B).

Las anotaciones GO de las proteínas exclusivas de cada tipo



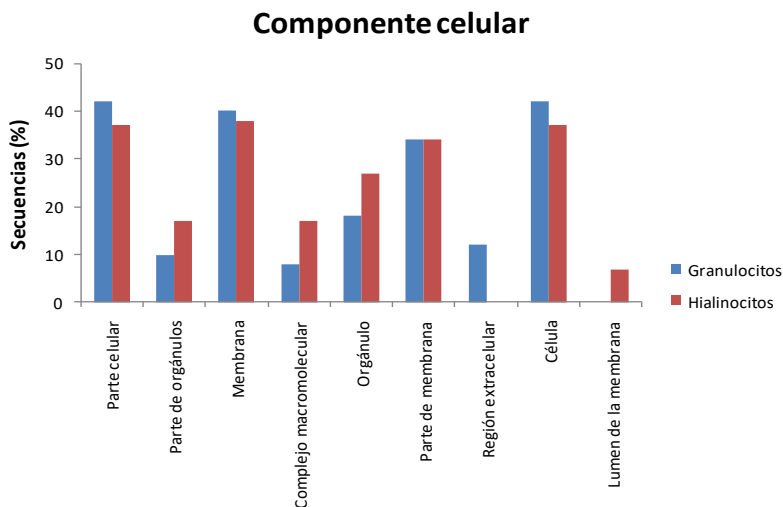
**Figura 2.** Información estadística sobre la búsqueda Blast y la anotación GO de las proteínas de **Hialinocitos** utilizando la herramienta Blast2GO. Distribución de datos (A) y distribución de especies de mayor impacto (B).

celular se analizaron indicando los procesos biológicos, el componente celular y los procesos moleculares a los que correspondían las secuencias de dichas proteínas. Estos datos se muestran en las figuras 3, 4 y 5.

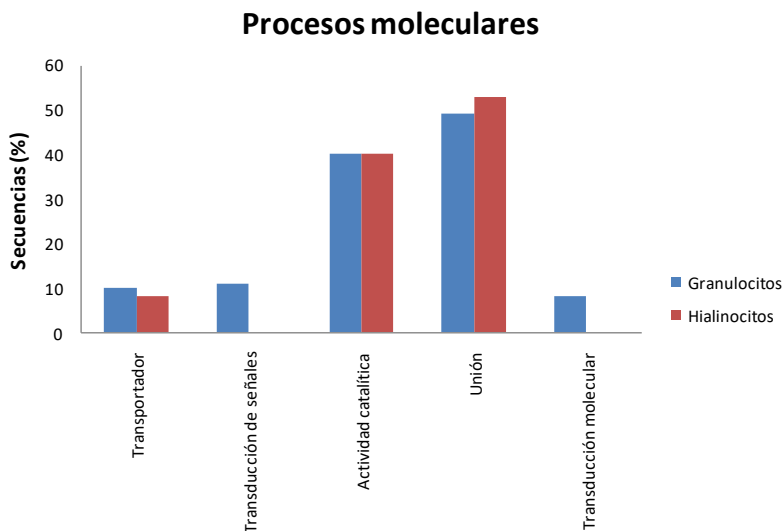


**Figura 3.** Porcentaje de secuencias proteicas de cada tipo celular que corresponden a cada uno de los procesos biológicos que se indican.

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* mediante el procedimiento de “shotgun”



**Figura 4.** Porcentaje de secuencias proteicas de cada tipo celular que corresponden a los diferentes componentes celulares.



**Figura 5.** Porcentaje de secuencias proteicas de cada tipo celular que corresponden a cada uno de los procesos moleculares que se indican.

### **5.3.3 Identificación de proteínas exclusivas de granulocitos e hialinocitos implicadas en la respuesta inmune**

Se constató la anotación de 24 proteínas con funciones inmunológicas en granulocitos y 17 en hialinocitos. Dentro de las proteínas exclusivas de granulocitos implicadas en el sistema inmune (Tabla 2) un porcentaje elevado (66,7%) se relacionaban con la señalización celular; además, se han identificaron proteínas implicadas con procesos de oxidación-reducción, citoesqueleto y apoptosis. Entre las proteínas con funciones inmunológicas identificadas en hialinocitos (Tabla 3), un 35,3% correspondían a proteínas implicadas en señalización celular y un 23,5% relacionadas con reconocimiento; además se identificaron proteínas que participan en detoxificación, apoptosis y citoesqueleto.





Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* mediante el procedimiento de “shotgun”

**Tabla 2.** Lista de proteínas del sistema inmune identificadas en los **Granulocitos** de ostras *Ostrea edulis* mediante LC-MS/MS y analizadas mediante el programa informático Blast2GO. **LONGITUD:** Longitud de la secuencia. **E-VALUE:** es el número de alineaciones distintas, con una puntuación igual o mejor que el “Score”, que se espera que ocurra en una búsqueda de base de datos debido al azar (a menor E-value, mejor emparejamiento). **HITS:** Número de emparejamientos exitosos. **GO:** ontología génica.

NUMERO DE ACCESO NCBI	NOMBRE DE LA PROTEINA	LONGITUD	HITS	E-VALUE	SIMILITUD	GO
EKC19473.1	1-Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato fosfodiesterasa gamma 1	1286	20	0.00e+00	80,65%	5
EKC40553.1	Subunidad 1A de la proteína 2/3 relacionada con la actina	360	20	0.00e+00	77,70%	3
AET43932.1	Isoforma X1 de la proteína 7 que contiene repeticiones de la proteína inhibidora de apoptosis baculoviral	132	20	2.03e-92	61%	9
EKC35367.1	Molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario	449	10	0.00e+00	73,70%	1
BAA89015.1	Citocromo c oxidasa subunidad I (mitocondrial)	509	20	0.00e+00	96,10%	9
EKC37205.1	Cistatina A2	124	20	4.13e-87	61,80%	3
EKC32668.1	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1-A	595	20	0.00e+00	65,20%	31
EKC41616.1	Quelato férrico reductasa 1	551	20	0.00e+00	61,20%	1
EKC32116.1	Isoforma X1 de Quelato férrico reductasa 1	1215	20	0.00e+00	62,85%	2
ABD67164.1	Proteínas G de unión a nucleótidos de guanina subunidad $\alpha$	284	20	0.00e+00	92,50%	9
sp P38412.1 GNAQ_LOLFO	Proteínas G de unión a nucleótidos de guanina subunidad $\alpha$	354	20	0.00e+00	90,85%	36
EKC41052.1	Isoforma X4 de la proteína 1 que interactúa con Huntingtina	1094	20	0.00e+00	76%	6
AED87588.1	Factor inducible de hipoxia-1 $\alpha$	701	20	0.00e+00	63,25%	4
ACD63428.1	Quinasa 1 activada por mitógenos	165	20	0.00e+00	98,95%	4
EKC43107.1	Isoforma X3 de proteína 1 de unión a proteína quinasa activada por mitógenos	1908	20	0.00e+00	83,35%	2

NUMERO DE ACCESO NCBI	NOMBRE DE LA PROTEINA	LONGITUD	HITS	E-VALUE	SIMILITUD	GO
EKC22556.1	Proteína 1 de translocación del linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas, isoforma X1	794	20	0.00e+00	50,90%	5
ACZ25560.1	Isoforma X2 del factor nuclear NF-kappa-β subunidad p105	1085	20	0.00e+00	78,65%	6
AAR92030.1	Proteína de reconocimiento de peptidoglicano SC2	189	20	0.00e+00	67,70%	4
AD124343.1	Poli [ADP-ribosa] polimerasa 3	229	20	0.00e+00	78,90%	9
EKC29987.1	Isoforma X1 de la proteína 1 que contienen dominios homólogos a pleckstrina y asociados a Ras	1349	20	0.00e+00	75%	1
EKC43210.1	Proteína 44 activadora de Rho GTPasa, parcial	928	20	0.00e+00	87,75%	2
EKC27160.1	Serina proteasa mitocondrial	313	20	0.00e+00	69,45%	2
EKC35003.1	Proteína 2 que contiene motivos tripartitos	986	20	0.00e+00	88,25%	2
EKC24728.1	Proteína 2 que contiene motivos tripartitos	443	20	0.00e+00	77,40%	1

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* mediante el procedimiento de “shotgun”

**Tabla 3.** Lista de proteínas del sistema inmune identificadas en los Hialinocitos de ostras *Ostrea edulis* mediante LC-MS/MS y analizadas mediante el programa informático Blast2GO. LONGITUD: Longitud de la secuencia. E-VALUE: es el número de alineaciones distintas, con una puntuación igual o mejor que el “Score”, que se espera que ocurra en una búsqueda de base de datos debido al azar (a menor E-value, mejor emparejamiento). HITS: Número de emparejamientos exitosos. GO: ontología génica.

NUMERO DE ACCESO NCBI	NOMBRE DE LA PROTEINA	LONGITUD	HITS	E-VALUE	SIMILITUD	GO
EKC41484.1	Proteína que contiene repeticiones de anquirina y armadillo	565	20	0.00e+00	65,15%	2
EKC40171.1	Proteína p60 que contiene repeticiones de anquirina	775	20	0.00e+00	54,80%	4
EKC23783.1	Proteína p55 que contiene repeticiones de anquirina	987	20	0.00e+00	69,55%	
EKC28851.1	Isoforma X2 de Caspasa 2	630	20	0.00e+00	66,20%	5
EKC24062.1	Potenciador de unión a cajas CCAAT	257	13	0.00e+00	74,54%	4
EKC31102.1	Proteína 2 similar a Monooxigenasa que contiene flavina FMO GS-OX	430	20	0.00e+00	66,55%	4
EKC40331.1	Isoforma X7 de filamina A	841	20	0.00e+00	81,35%	1
EKC37204.1	Isoforma X1 de galectina 4	555	20	0.00e+00	76,65%	1
EKC28012.1	Histona H2A	126	20	1.56e-51	98,80%	4
EKC42222.1	Integrina beta D	421	20	0.00e+00	62,45%	2
EKC32500.1	Proteína 4 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad	818	20	0.00e+00	70,10%	1
EKC32371.1	Metalotioneína IV	128	4	1.38e-62	96%	1
EKC32282.1	Dominio 10 similar al factor de crecimiento epidérmico múltiple	397	20	0.00e+00	60,65%	1
ACK99488.1	Mitocina C	100	20	3.67e-44	98,35%	
EKC40199.1	Subunidad 4 reguladora de fosfatidilinositol 3-quinasa	1360	20	0.00e+00	69,70%	10
NP_001191466.1	Isoforma X1 del receptor 1 transmembrana tirosina-quinasa ROR1	1145	20	0.00e+00	67,80%	5
EKC38224.1	Isoforma X1 de espectrina cadena $\alpha$	2475	20	0.00e+00	85,85%	1

## 5.4 DISCUSIÓN

Mediante la técnica LC-MALDI/MS el número de proteínas identificadas como exclusivas es prácticamente igual entre granulocitos (114) e hialinocitos (112), mientras que aquellas proteínas exclusivas implicadas en el sistema inmune son más numerosas en granulocitos (24) que en hialinocitos (17). Es comúnmente asumida la hipótesis de que los granulocitos son el principal tipo hemocitario implicado en la defensa inmune de bivalvos (Carballal *et al.*, 1997c; Donaghy & Volety, 2011; Hégaret *et al.*, 2003; Terahara *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2017); nuestros resultados son coherentes con tal hipótesis.

El número de invertebrados marinos, incluidos moluscos, de los que se dispone de la secuencia de su genoma es muy reducido, por lo que los estudios proteómicos de los invertebrados marinos ha de basarse en la información de secuencias de proteínas de especies estrechamente relacionadas (Carpentier *et al.*, 2008; Grossmann *et al.*, 2007). Este es el caso de *O. edulis*, con un número reducido de secuencias de genes/proteínas en las bases de datos, mientras que el genoma de la ostra del pacífico *C. gigas* está completamente secuenciado (G. Zhang *et al.*, 2012). Por tanto la gran mayoría de las proteínas identificadas en nuestro estudio, tanto en granulocitos como en hialinocitos, se ha logrado gracias a la similitud con secuencias pertenecientes a *C. gigas*.

Considerando las funciones y procesos biológicos y moleculares de todas las proteínas exclusivas identificadas y, en particular, las de aquellas asociadas al sistema inmune, llama la atención que dentro de granulocitos había mayor número de proteínas implicadas en señalización celular, apoptosis y, en menor medida, procesos redox y citoesqueleto, mientras que en hialinocitos se detectó un número mayor de proteínas relacionadas con reconocimiento o unión, lo que sustenta la visión previa de que los dos tipos hemocitarios de *O. edulis* desempeñan funciones inmunológicas diferentes. En la tabla 4 se muestran las proteínas exclusivas identificadas en cada tipo hemocitarios agrupadas por las funciones que desempeñan.

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* mediante el procedimiento de “shotgun”

**Tabla 4.** Lista de proteínas exclusivas identificadas en cada tipo hemocitario, agrupadas por función biológica.

Función biológica	Proteína identificada	Tipo hemocitario
Transducción de señales	- Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato fosfodiesterasa gamma 1 (PLC $\gamma$ 1)	Granulocito
	- Isoforma X1 de la proteína 7 que contiene repeticiones de la proteína inhibidora de apoptosis baculoviral	
	- Molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM1)	
	- Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1-A (FGFR1A)	
	- Proteínas G de unión a nucleótidos de guanina subunidad $\alpha$	
	- Factor inducible de hipoxia-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )	
	- Quinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1)	
	- Isoforma X3 de la proteína 1 de unión a quinasa activada por mitógenos	
	- Proteína 1 de translocación de linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas, isoforma X1 (MALT1)	
	- Isoforma X2 del factor nuclear NF- $\kappa$ B subunidad p105	
	- Proteína de reconocimiento de peptidoglicano SC2	
	- Isoforma X1 de la proteína 1 que contienen dominios homólogos a pleckstrina y asociados a Ras	
	- Proteína 44 activadora de Rho GTPasa, parcial	
	- Serina proteasa mitocondrial (HtrA2)	
	- Proteína 2 que contiene motivos tripartitos (TRIM2)	
- Proteína que contiene repeticiones de anquirina y armadillo	Hialinocito	
- Proteína p60 que contiene repeticiones de anquirina		
- Proteína p55 que contiene repeticiones de anquirina		
- Isoforma X7 de filamina A		
- Integrina $\beta$ D		
- Proteína 4 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDR4)		
- Subunidad 4 reguladora de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)		
- Isoforma X1 del receptor 1 transmembrana Tirosina-quinasa ROR1		

Función biológica	Proteína identificada	Tipo hemocitario			
Apoptosis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isoforma X1 de la proteína 7 que contiene repeticiones de la proteína inhibidora de apoptosis baculoviral</li> <li>- Cistatina A2</li> <li>- Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1-A (FGFR1A)</li> <li>- Isoforma X4 de la proteína 1 que interactúa con huntingtina (HIP1)</li> <li>- Quinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1)</li> <li>- Isoforma X3 de la proteína 1 de unión a quinasa activada por mitógenos</li> <li>- Proteína 1 de translocación del linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas, isoforma X1 (MALT1)</li> <li>- Isoforma X2 del factor nuclear NF-<math>\kappa</math>B subunidad p105</li> <li>- Poli [ADP-ribosa] polimerasa 3 (PARP3)</li> <li>- Isoforma X1 de la proteína 1 que contienen dominios homólogos a pleckstrina y asociados a Ras</li> <li>- Proteína 44 activadora de Rho GTPasa, parcial</li> <li>- Serina proteasa mitocondrial (HtrA2)</li> <li>- Proteína 2 que contiene motivos tripartitos (TRIM2)</li> </ul>	Granulocito			
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isoforma X2 de Caspasa 2</li> <li>- Potenciador de unión a cajas CCAAT (C/EBP)</li> <li>- Isoforma X1 de galectina 4</li> <li>- Integrina <math>\beta</math> D</li> <li>- Metalotioneína IV (MT-IV)</li> <li>- Subunidad 4 reguladora de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)</li> </ul>		Hialinocito		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM1)</li> <li>- Proteína de reconocimiento de peptidoglicano SC2</li> </ul>			Granulocito	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Isoforma X1 de galectina 4</li> <li>- Histona H2A</li> <li>- Integrina <math>\beta</math> D</li> </ul>				Hialinocito
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proteína 4 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDR4)</li> <li>- Dominio 10 similar al Factor de crecimiento epidérmico múltiple (MEGF10)</li> <li>- Miticina C</li> </ul>				

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* mediante el procedimiento de “shotgun”

Función biológica	Proteína identificada	Tipo hemocitario
Procesos redox	- Subunidad I de la citocromo c oxidasa (mitocondrial) - Quelato férrico reductasa 1 - Isoforma X1 de Quelato férrico reductasa 1 - Proteínas G de unión a nucleótidos de guanina subunidad $\alpha$ - Factor inducible de hipoxia-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )	Granulocito
	- Proteína 2 similar a monooxigenasa que contiene flavina FMO GS-OX - Metalotioneína IV (MT-IV) - Subunidad 4 reguladora de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)	Hialinocito
Citoesqueleto	- Subunidad 1A de la proteína 2/3 relacionada con actina - Isoforma X4 de la proteína 1 que interactúa con huntingtina (HIP1) - Proteína 44 activadora de Rho GTPasa, parcial	Granulocito
	- Isoforma X7 de filamina A - Isoforma X1 de espectrina cadena $\alpha$ - Cistatina A2	Hialinocito
Otras	- Quelato férrico reductasa 1 - Serina proteasa mitocondrial (HtrA2)	Granulocito
	- Potenciador de unión a cajas CCAAT (C/EBP) - Isoforma X1 de galectina 4 - Miticina C	Hialinocito

### 5.4.1 Proteínas identificadas implicadas en transducción de señales

Una compleja red de señalización celular ocurre en la respuesta inmune de diversos invertebrados, entre ellos las ostras. En granulocitos se han identificado 24 proteínas exclusivas de este tipo celular que participan en funciones inmunes de las cuales 15 están implicadas en transducción de señales. En el caso de hialinocitos, de las 17 proteínas identificadas de manera exclusiva y relacionadas con el sistema inmune, 8 están implicadas en transducción de señales.



En granulocitos se ha identificado la proteína 1-fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato fosfodiesterasa gamma 1 o fosfoinosítido fosfolipasa C gamma 1 (PLC $\gamma$ 1), responsable de la producción de los segundos mensajeros Diacilglicerol (DAG) e Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3), componentes esenciales en mecanismos de transducción de señales (Bloomquist *et al.*, 1988). PLC $\gamma$  está implicada en proliferación y migración celular y en procesos de cicatrización de heridas (Wells, 1999). Existen evidencias sustanciales que apoyan la participación de las fosfolipasas en la señalización fagocítica (Lennartz, 1999; May & Machesky, 2001). Concretamente, se ha observado que la inhibición de PLC $\gamma$  bloquea la fagocitosis (Seastone *et al.*, 1999).

También se identificó la isoforma X1 de la proteína 7 que contiene repeticiones de la proteína baculoviral inhibidora de apoptosis (*Baculoviral IAP*) en granulocitos. Las proteínas con repeticiones de *Baculoviral IAP* (BIR), son proteínas multifuncionales que regulan la expresión de caspasas, la apoptosis, la señalización inflamatoria y las respuestas inmunes (Rosani *et al.*, 2015). Se ha observado que la expresión de Baculoviral IAP de *C. virginica* disminuye en respuesta al parásito *P. marinus* (Wang *et al.*, 2010). En *C. gigas*, la expresión del gen *Baculoviral IAP* aumenta su expresión tras la infección por OsHV-1 (Rosani *et al.*, 2015; Segarra *et al.*, 2014) y tras una infección bacteriana (de Lorgeril *et al.*, 2011). El gen *Baculoviral IAP* de *O. edulis* se ha observado sobrepresado en respuesta a *B. ostreae* en ostras resistentes al parásito (Morga *et al.*, 2012). En este sentido es reseñable la importancia de los procesos de apoptosis en dicha relación parásito-hospedador (Gervais *et al.*, 2016).

Dentro de granulocitos se identificó la molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM1). CEACAMs son receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Chen *et al.*, 2015) que participan en la transducción de señales en la célula (Hammarström, 1999). Se ha documentado que en humanos, existen CEACAMs que se expresan en granulocitos y son capaces de unirse a patógenos proporcionando una respuesta inmune innata para controlar la infección (Schmitter *et al.*, 2004).

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* mediante el procedimiento de “shotgun”

Otra de las proteínas exclusivas de granulocitos fue el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1-A (FGFR1A). La señalización por factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) está implicada en muchos procesos biológicos, incluyendo desarrollo embrionario, organogénesis, regeneración y cicatrización de heridas (Goetz & Mohammadi, 2013). Además FGFR está implicado en vías de señalización Ras-MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), una de las cascadas más importantes en el control de variedad de procesos fisiológicos incluyendo la inmunidad innata (Gerdol & Venier, 2015; Technau *et al.*, 2005). Se ha documentado la presencia de FGFRs en ostras (X. D. Huang *et al.*, 2013).

Otra de las proteínas exclusivas de granulocitos se identificó como la proteína G de unión a nucleótidos de guanina subunidad  $\alpha$ . Las proteínas G de unión a nucleótidos de guanina son glicoproteínas ancladas en la membrana celular citoplasmática y se conocen como proteínas de unión a GTP, GTPasas. Son mediadores de muchos procesos celulares, incluyendo transducción de señales, transporte de proteínas, regulación del crecimiento y alargamiento de la cadena polipeptídica (D. Wang *et al.*, 2011). Se trata de uno de los grupos de proteínas de señalización más importantes que regulan la función inmune, regulando las concentraciones intracelulares de iones, azúcares y AMPc (De Vries *et al.*, 2000). La expresión de proteínas G de unión a nucleótidos de guanina aumenta significativamente en vieiras *Chlamys farreri* expuestas a diferentes inductores del sistema inmune, como lipopolisacáridos (LPS) (Z. Sun *et al.*, 2014a). En ostras *C. gigas* y *C. virginica* se ha documentado una sobreexpresión de dicha proteína en respuesta al parásito *P. marinus* (Tanguy *et al.*, 2004) y en *O. edulis* se han observado GTPasas tras una infección experimental con el parásito *B. ostreae* (Harrang *et al.*, 2015).

En granulocitos también se identificó el factor inducible de hipoxia-1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ). Dicha proteína controla la expresión de genes claves que apoyan el metabolismo y la supervivencia en la hipoxia y la anoxia, incluyendo aquellos involucrados en la glucólisis, absorción y transporte de glucosa, metabolismo mitocondrial, homeostasis ácido-base y señalización celular (Semenza, 2007). Además, HIF-1

parece jugar un papel crítico en el mantenimiento de la estructura e integridad del ADN o del ARN (D.-Z. Wang *et al.*, 2011).

Dos proteínas exclusivas de granulocitos se identificaron como quinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1) e isoforma X3 de la proteína 1 de unión a quinasa activada por mitógenos. Las MAPKs forman parte de una de las vías de señalización más importantes en el control de variedad de procesos fisiológicos incluyendo proliferación celular, crecimiento, diferenciación, muerte celular, inmunidad innata, respuestas al estrés ambiental y desarrollo; dicha cascada podría actuar en las vías de señalización intracelulares mediadas por receptores tipo Toll (TLR) y proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (PGRP) de bivalvos (Gerdol & Venier, 2015). Hay diversos estudios que demuestran la existencia de la cascada MAPK en ostras y su implicación en procesos patológicos; la infección bacteriana de *C. gigas* produce la activación de proteínas MAPKs (de Lorgeril *et al.*, 2011; T. Zhang *et al.*, 2014). En la misma especie, genes asociados con la vía MAPK se expresan en respuesta al virus OsHV-1 (Jouaux *et al.*, 2013; Renault *et al.*, 2011). De la misma manera ocurre en patologías provocadas por parásitos; en *O. edulis*, genes MAPKs se sobreexpresan significativamente como consecuencia de la infección por *B. ostreae* (Martín-Gómez *et al.*, 2012) y el parásito *P. marinus* induce la activación de la vía de señalización MAPK en ostras *C. gigas* y *C. virginica* (Tanguy *et al.*, 2004).

Además, en granulocitos se identificaron la isoforma X2 del factor nuclear NF-kappa- $\tau$  subunidad p105 y la isoforma 1 de la proteína 1 de translocación del linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT1). El factor nuclear kappa- $\tau$  (NF- $\kappa\tau$ ) tiene un papel central en la coordinación de la expresión de una amplia variedad de genes que controlan respuestas inmunes (Li & Verma, 2002). Los miembros de la familia NF- $\kappa\beta$  controlan la transcripción de citoquinas y efectores antimicrobianos, así como los genes que regulan la diferenciación celular, la supervivencia y proliferación, regulando así varios aspectos de las respuestas inmunes innatas (Hayden *et al.*, 2006). MALT1 es uno de los componentes esenciales, necesarios para el correcto funcionamiento de la vía de señalización NF- $\kappa\tau$  (Hayden *et*

*al.*, 2006). Diferentes factores imprescindibles en la cascada NF- $\kappa$  están implicados en relaciones de susceptibilidad o de resistencia frente a patógenos en ostras; así se han identificado miembros de la familia NF- $\kappa$  relacionados con la resistencia de *C. gigas* frente a la mortalidad estival (Fleury & Huvet, 2012); con la infección vírica por OsHV-1 en *C. gigas* (Normand *et al.*, 2014; Rosani *et al.*, 2015; Segarra *et al.*, 2014); con la progresión de la neoplasia diseminada en *O. edulis* (Martín-Gómez *et al.*, 2013) y con la respuesta inmune a la infección bacteriana en ostras *Pinctada fucata* y *Saccostrea glomerata* (Green & Barnes, 2009; Zhang *et al.*, 2009b).

Dentro de granulocitos se ha identificado como exclusiva la proteína de reconocimiento de peptidoglicano SC2. Las proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (PGRPs) desempeñan un papel central en la activación de diversas reacciones inmunes, tales como la activación de vías de transducción de señales tipo Toll o Inmunodeficiencia (IMD) con el fin de producir sustancias antibacterianas capaces de hidrolizar peptidoglicano, protegiendo así al huésped contra la infección (Royet & Dziarski, 2007). Los PGRPs son componente indispensable en la inmunidad de bivalvos (Song *et al.*, 2010); siendo esenciales en la activación de procesos de vital importancia como la fagocitosis (Royet & Dziarski, 2007).

Otra proteína específica de granulocitos correspondió a la isoforma X1 de la proteína 1 que contienen dominios homólogos a pleckstrina y asociados a Ras. La cascada de señalización Ras-ERK, juega un papel importante en la proliferación, diferenciación, apoptosis y transformación oncogénica (Chang & Karin, 2001; Lewis *et al.*, 1998; Matsunaga-Udagawa *et al.*, 2010; Sturgill & Wu, 1991). El dominio PH (homólogo de Pleckstrina), estimula la vía de señalización MAPK (Therrien *et al.*, 1999).

Otra proteína exclusiva de granulocitos correspondió a la proteína 44 activadora de Rho GTPasa, parcial. La proteína activadora de Rho GTPasa 44, tiene una conexión importante con la respuesta inmune ya que está implicada en la regulación de la familia Rho GTPasas; éstas son proteínas de señalización intracelular que regulan múltiples vías

implicadas en la defensa del organismo (Hall, 1994; Lacal, 1997; Mulloy *et al.*, 2010). La familia de Rho GTPasas participan en muchos procesos esenciales en la coordinación de la compleja maquinaria subyacente a la inmunidad innata (Bokoch, 2005). Las Rho GTPasas y sus proteínas de activación tienen una implicación clara en el sistema inmune de ostras; por ejemplo, se han observado Rho GTPasas que participan en la respuesta antibacteriana de *C. gigas* (de Lorgeril *et al.*, 2011; McDowell *et al.*, 2014; T. Zhang *et al.*, 2014); en ostras *C. virginia* infectadas por *P. marinus*, la expresión de proteínas de activación de Rho GTPasa aumenta (Tanguy *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010); en el caso de *O. edulis* afectadas por neoplasia diseminada existe una disminución en la expresión de Rho GTPasa (Martín-Gómez *et al.*, 2013).

La serina proteasa mitocondrial (HtrA2) fue otra de las proteínas exclusivas de granulocitos. Las proteasas sirven como moduladores inmunes claves, comúnmente asociadas con lisosomas y gránulos de células inflamatorias; las serina proteasas participan en la regulación inmune directamente por degradación de patógenos o indirectamente a través de la activación de receptores de superficie celular y moléculas señal (Meyer-Hoffert & Wiedow, 2011; Shpacovitch *et al.*, 2008). HtrA2 participa en la respuesta al estrés celular de moluscos (Lockyer *et al.*, 2007) y están implicadas en diferentes procesos inmunológicos tales como coagulación y fagocitosis entre otros (Rawlings & Barrett, 1993). Varias serina proteasas participan en el sistema defensivo de bivalvos, como viciras (Huan *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009b) y almejas, donde diferentes serina proteasas se sobreexpresan en respuesta al parásito QPX (Wang *et al.*, 2016) y están implicadas en la respuesta antibacteriana (Araya *et al.*, 2010; Prado-Alvarez *et al.*, 2012).

Otra de las proteínas exclusivas de granulocitos correspondió a la proteína 2 que contiene motivos tripartitos (TRIM2). Las proteínas que contienen motivos tripartitos (TRIM) están involucradas en regulación de la transcripción y transducción de señales, teniendo un papel esencial en la regulación de la inmunidad innata (Kawai & Akira, 2011; McNab *et al.*, 2011; Ozato *et al.*, 2008). Estudios

recientes han demostrado que la activación de varias vías de señalización de suma importancia en el sistema inmune como NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa- $\kappa$ ) están reguladas por múltiples moléculas, incluyendo la familia de proteínas TRIM (Kawai & Akira, 2011). TRIM es uno de los genes implicado en la respuesta antiviral en moluscos (He *et al.*, 2015). El gen TRIM2 puede inhibir la transcripción viral; se sobreexpresa en ostras *C. gigas* infectadas por el OsHV-1 (He *et al.*, 2015; Jouaux *et al.*, 2013; Rosani *et al.*, 2015) y tras la exposición a Poly I:C (Green *et al.*, 2015a, 2016a, 2016b). Dicha proteína está fuertemente implicada en la inmunidad antiviral, por lo que ciertos virus podrían modular la expresión de estas proteínas con el objetivo de evadir la defensa del hospedador (Zhao *et al.*, 2012). Las proteínas TRIM son un importante factor inmune en ostras (Guo *et al.*, 2015; Guo & Ford, 2016).

En el caso de hialinocitos, tres proteínas exclusivas correspondían a las proteínas p60 que contiene repeticiones de anquirina, p55 que contiene repeticiones de anquirina y proteína que contiene repeticiones de anquirina y armadillo. Las repeticiones de anquirina (AR) están presentes en muchas proteínas biológicamente importantes, y funcionan como reguladores de interacciones específicas proteína-proteína (Ghosh *et al.*, 1998), por lo que tienen gran relevancia en la señalización celular. Las repeticiones de anquirina (AR) son responsables de la interacción con proteínas NF- $\kappa$ B, y por tanto, participan en la activación de la vía de señalización NF- $\kappa$ B (Baldwin, 1996). Se cree que el gen armadillo participa en la señalización TLR (McGettrick & O’Neill, 2004); además, se ha observado que la expresión de este gen aumenta en *C. gigas* infectada por OsHV-1 (Jouaux *et al.*, 2013). Los dominios de anquirina se consideran importantes factores relacionados con la inmunidad innata de diferentes ostras (L. Zhang *et al.*, 2014), así se han observado genes de proteínas con dominios AR cuya expresión varía entre ostras *C. gigas* resistentes y susceptibles a la mortalidad estival (Fleury & Huvet, 2012); dichos genes presentan una expresión diferencial ante una infección bacteriana en *C. virginica* (McDowell *et al.*, 2014). Las proteínas p60 que contiene repeticiones de anquirina se encuentran entre los candidatos a formar parte de la respuesta antiviral de ostras



(Rosani *et al.*, 2015). Además, el dominio AR es uno de los genes de *O. edulis* que presentan una expresión condicionada por la presencia del parásito *B. ostreae* (Martín-Gómez *et al.*, 2012); otro estudio sugiere que es una de las proteínas que confieren supervivencia a la ostra europea frente al parásito (Harrang *et al.*, 2015).

Otra de las proteínas exclusivas de hialinocitos se identificó como la isoforma X7 de filamina A. Las filaminas pueden desempeñar un papel importante en las interacciones proteína-proteína, por lo general interactuando con los receptores de membrana para las moléculas de señalización celular. Esta proteína tiene un papel activo en las vías de señalización a través de la activación de NF- $\kappa$ B con una función clave en la regulación de la respuesta inmune frente a infecciones (Feng & Walsh, 2004; Vasselon, 2002). También participa en la señalización celular de moluscos (Lockyer *et al.*, 2007).

En hialinocitos también se identificó la proteína integrina  $\beta$  D como exclusiva de este tipo hemocitario. La respuesta inmune celular de hemocitos de bivalvos también está modulada por integrinas, que conllevan la transmisión de señales adecuadas en el citoplasma y son esenciales en procesos de degranulación, fagocitosis y encapsulación en invertebrados (Tyrer *et al.*, 2006). Una de las vías principales de señalización mediadas por integrinas en la fagocitosis es la vía PI3K, que conduce a la activación de la familia Rho GTPasas (Berton & Lowell, 1999). Las integrinas son esenciales en procesos de degranulación, fagocitosis y encapsulación en invertebrados (Tyrer *et al.*, 2006). Diversas integrinas están implicada en la interacción de *C. gigas* con el virus OsHV-1 (Jouaux *et al.*, 2013) y con bacterias (T. Zhang *et al.*, 2014). En la misma especie, la integrina- $\beta$  está relacionada con la resistencia de la ostra a la mortalidad estival (Fleury & Huvet, 2012). Varias integrinas se sobreexpresan en *M. mercenaria* en respuesta a la infección por QPX (Wang *et al.*, 2016). La expresión de la integrina- $\alpha$  varía como consecuencia a la infección por parásitos del género *Perkinsus* en *C. gigas* y *R. philippinarum* (Fernández-Boo *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2010).



## Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* mediante el procedimiento de “shotgun”

La proteína 4 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDR4) fue otra de las proteínas exclusivas de hialinocitos. Los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) están implicados en la transmisión de señales intracelulares y extracelulares (Gotthardt *et al.*, 2000). Las proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDR) pertenecen a la vía de señalización WNT (sitio integrado relacionado con Wingless) capaz de regular muchos procesos inmunes (Staal *et al.*, 2008). La expresión del gen LDLR aumenta en *O. edulis* infectada por *B. ostreae* (Morga *et al.*, 2012). *C. gigas* con una infección por OsHV-1 presenta una disminución en la expresión de la proteína LDR (Corporeau *et al.*, 2014). Se han detectado LDLRs en moluscos con función antiviral, uniéndose al virus WSSV e inhibiendo su replicación y diseminación (Xu *et al.*, 2014).

Otra de las proteínas exclusivas de hialinocitos se identificó como la subunidad 4 reguladora de fosfatidilinositol 3-quinasa (IP3K). La vía de señalización IP3K está claramente implicada en la inmunidad de bivalvos (Moreira *et al.*, 2012a), participando en la regulación de la respuesta inmune para evitar auto-daño por una reacción inflamatoria incontrolada (Moreira *et al.*, 2014). PI3K es la principal fosfoinositol quinasa implicada en fagocitosis (May & Machesky, 2001). La expresión de IP3K varía en *O. edulis* afectada por bonamiosis (Martín-Gómez *et al.*, 2012) y es activada en *C. gigas* en respuesta a una infección bacteriana (T. Zhang *et al.*, 2014) y a una infección vírica (Jouaux *et al.*, 2013).

Dentro de hialinocitos se ha identificado la isoforma X1 del receptor 1 transmembrana Tirosina-quinasa ROR1. Las proteínas receptor transmembrana tirosina quinasa (ROR) son una familia conservada de receptores que funcionan en procesos de desarrollo incluyendo el desarrollo neuronal, el movimiento celular y la polaridad celular. Además ROR se consideran reguladores centrales de la señalización WNT (Green *et al.*, 2008). La vía WNT presenta funciones reguladoras durante la cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos (Fathke *et al.*, 2006; Z. Zhang *et al.*, 2009); componentes de dicha vía de señalización se han observado

sobreexpresados en bivalvos en respuesta a una infección parasitaria (Wang *et al.*, 2016).

Se ha identificado un número mucho mayor de proteínas implicadas en vías de señalización relevantes en el sistema inmune en granulocitos (15) que en hialinocitos (8); lo que es coherente con una mayor participación de granulocitos en la inmunidad del individuo. Diversos estudios concuerdan con el hecho de que los granulocitos son el principal tipo de hemocito involucrado en la defensa inmune de los bivalvos (Carballal *et al.*, 1997b; Donaghy and Volety, 2011; Hégaret *et al.*, 2003; Terahara *et al.*, 2006); Recientemente en ostras los granulocitos se han considerado los principales hemocitos inmunocompetentes (Wang *et al.*, 2017). Mientras que las proteínas identificadas en granulocitos participan principalmente en vías de señalización MAPK, Ras y NF- $\kappa$ B, varias de las proteínas identificadas en hialinocitos están implicadas en la vía de señalización WNT, dicha cascada se ha documentado ampliamente por sus funciones reguladoras durante la cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos (Fathke *et al.*, 2006; Z. Zhang *et al.*, 2009); su activación se ha relacionado con la cicatrización de heridas para reparar daños resultantes de la digestión de tejidos causadas por parásitos y tejidos necróticos en bivalvos (Wang *et al.*, 2016). Estudios previos indican una especialización de los hialinocitos en agregación y reparación de heridas (Ruddell, 1971; Suzuki *et al.*, 1991), nuestros resultados parecen concordar con este hecho al identificar la vía de señalización WNT más relacionada con hialinocitos que con granulocitos.

#### **5.4.2 Proteínas identificadas implicadas en apoptosis**

La apoptosis desempeña un papel clave en la homeostasis y la función del sistema inmunitario (Sokolova, 2009). La apoptosis de los hemocitos parece ser una respuesta inmune celular general en moluscos (Kiss, 2010); dicho proceso es crucial en la supervivencia del organismo, especialmente cuando los moluscos se enfrentan a patógenos y procesos de toxicidad ambiental (Kiss, 2010; Schaumburg *et al.*, 2006; Sokolova, 2009). En nuestros resultados,

una parte importante de las proteínas identificadas en granulocitos e hialinocitos tienen un papel significativo en apoptosis, encontrándose diferencias entre los dos tipos hemocitarios.

En la sección 5.4.1 de proteínas implicadas en vías de señalización se incluye la isoforma X1 de la proteína 7 que contiene repeticiones de la proteína baculoviral inhibidora de apoptosis, identificada en granulocitos. Las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) contribuyen significativamente a la regulación de la muerte celular mediante la supresión de la apoptosis (Deveraux *et al.*, 1999), la activación de los receptores de muerte (Krammer, 2000) y la influencia de otros mediadores de la apoptosis (Salvesen & Duckett, 2002). Las IAPs están implicadas de manera relevante en la inmunidad de moluscos (Sokolova, 2009), y son también importantes en el sistema inmune de ostras (Sunila & LaBanca, 2003; L. Zhang *et al.*, 2014, 2011b). Las ostras *C. gigas* y *C. virginica* han mostrado una expansión en los genes clave relacionados con la apoptosis como IAPs, con al menos 40, mientras en otros invertebrados marinos hay muchos menos, 3 en la anémona y 8 en el erizo de mar (G. Zhang *et al.*, 2012). El aumento de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis se considera uno de los mecanismos centrales en la asombrosa resistencia de las ostras a las condiciones estresantes y ricas en patógenos de la zona intertidal (G. Zhang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015).

Otra de las proteínas exclusivas de granulocitos se identificó como cistatina A2. Las cistatinas son inhibidores de la cisteína proteasa que se han identificado en todos los organismos vivos (Abrahamson *et al.*, 2003), controlan la actividad de catepsinas, moléculas fuertemente implicadas en apoptosis (Conus & Simon, 2008) y están involucradas en diversos procesos biológicos, incluyendo procesos inmunes (Abrahamson *et al.*, 2003). Los miembros de la superfamilia cistatina tienen propiedades inmunomoduladoras y propiedades reguladoras de las citoquinas, evitando así inflamación (Ochieng & Chaudhuri, 2010). Las cistatinas también pueden interactuar con inhibidores de metaloproteinasa de tejidos (TIMPs) y otras proteasas en procesos patofisiológicos que

requieren remodelación tisular y que van desde la supervivencia y proliferación celular hasta la diferenciación y señalización celular (Kopitar-Jerala, 2006). Las cistatinas pueden desempeñar papeles críticos en las respuestas antiparasitarias (Armstrong, 2006), también en moluscos (Guillou *et al.*, 2007; Lockyer *et al.*, 2012; Vergote *et al.*, 2005). Se han identificado cistatinas entre los transcriptomas de almejas *R. philippinarum* implicados en la respuesta a la infección por *P. olsenii* (Kang *et al.*, 2006) y en los transcriptomas implicados en la respuesta inmune de *C. gigas* frente a patógenos (de Lorgeril *et al.*, 2011; Rosani *et al.*, 2015). Las cistatinas A tienen una función de defensa contra patógenos exógenos (Pavlova & Björk, 2003; Turk & Bode, 1991). Se ha encontrado cistatina A2 en el nácar de *C. gigas*, con un posible papel defensivo del organismo contra microorganismos invasores y parásitos (Oliveira *et al.*, 2012). En *O. edulis* se ha documentado una sobreexpresión de cistatina como consecuencia de la infección por el parásito *B. ostreae* (Morga *et al.*, 2012); se ha observado que *B. ostreae* tiene mayor capacidad de multiplicación en el interior de hialinocitos que en granulocitos, lo que sugiere que el sistema defensivo de granulocitos es más eficaz (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a); a ello podría contribuir la cistatina A2, por su papel crucial en respuestas antiparasitarias.

La isoforma X4 de la proteína 1 que interactúa con huntingtina (HIP1) fue a otra de las proteínas exclusivas de granulocitos. HIP1 está implicada en procesos de apoptosis en organismos superiores (Hackam *et al.*, 2000; Raychaudhuri *et al.*, 2007) y en ostras (Meistertzheim *et al.*, 2007). Se ha sugerido que un tipo de HIP previene patologías tales como inflamación y génesis de tumores en *C. gigas* (Meistertzheim *et al.*, 2007).

Otra de las proteínas exclusivas de granulocitos se identificó como la isoforma X1 de la proteína 1 que contienen dominios homólogos de pleckstrina y asociados a Ras. La cascada de señalización Ras-ERK es crucial en diferentes funciones inmunes, entre ellas la apoptosis (Sturgill & Wu, 1991; Lacal, 1997; Lewis *et al.*, 1998; Chang & Karin, 2001; Matsunaga-Udagawa *et al.*, 2010).

## Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* mediante el procedimiento de “shotgun”

Entre las proteínas exclusivas de granulocitos también se identificó la poli [ADP-ribosa] polimerasa 3 (PARP3). PARP está implicada en reparación de ADN y apoptosis (Hartwig, 2001; Yu *et al.*, 2006). El estrés oxidativo induce la activación PARP, la fragmentación del ADN y la apoptosis (Raza & John, 2006). La expresión de PARP varía bajo condiciones de estrés en *C. gigas* (Boutet *et al.*, 2004a; Zhang *et al.*, 2015).

Además, algunas de las proteínas identificadas como exclusivas de granulocitos que se han tratado en la sección 5.4.1, correspondiente a vías de señalización, también tienen relación con la apoptosis, como es el caso de la quinasa 1 activada por mitógenos (MAPK1) y de la isoforma X3 de la proteína 1 de unión a quinasa activada por mitógenos; las MAPKs también participan en el control de procesos de muerte celular (Gerdol & Venier, 2015). También es el caso de la isoforma X2 del factor nuclear NF-kappa- $\tau$  subunidad p105 y MALT1. Los miembros de la familia NF-k $\beta$  controlan la transcripción de citoquinas y efectores antimicrobianos (Hayden *et al.*, 2006). MALT1 es uno de los componentes esenciales, necesarios para el correcto funcionamiento de la vía de señalización NF-k $\tau$  (Hayden *et al.*, 2006), existen citoquinas relacionadas con apoptosis (Ottaviani *et al.* 1997; Ottaviani *et al.* 2004; Barcia & Ramos-Martinez 2008). La proteína activadora de Rho GTPasa 44 también participa en la regulación de la apoptosis (Hall, 1994; Lacal, 1997; Mulloy *et al.*, 2010). En el caso de la serina proteasa mitocondrial (HtrA2), se ha demostrado que HtrA2 está implicada en procesos de apoptosis de varios organismos, entre otros en moluscos (Jeyaraju *et al.*, 2009; Kiss, 2010; Sokolova, 2009; Suzuki *et al.*, 2004). En cuanto a la proteína 2 que contiene motivos tripartitos (TRIM2), las TRIMs participan en procesos apoptóticos (Kawai & Akira, 2011; McNab *et al.*, 2011; Ozato *et al.*, 2008).

En hialinocitos se identificó como proteína exclusiva la isoforma X2 de caspasa 2. Las caspasas son una familia de proteasas muy importantes para mantener la homeostasis a través de la regulación de la apoptosis y la inflamación; formando parte de la mayoría de las vías apoptóticas (Creagh *et al.*, 2003). Se han observado caspasas

implicadas en una respuesta antiviral (He *et al.*, 2015) y antibacteriana (Araya *et al.*, 2010; K.-J. Wang *et al.*, 2008). En ostras se encuentran entre los genes del sistema inmune más importantes en comparación con otros organismos (Guo *et al.*, 2015).

Otra de las proteínas exclusivas de hialinocitos correspondió a la proteína potenciadora de unión a cajas CCAAT (C/EBP). Los C/EBPs son factores de transcripción que participan en diversos procesos biológicos, algunos de los cuales están implicados en el sistema inmune como los procesos inflamatorios (Friedman *et al.*, 2003). Dichos factores de transcripción regulan la expresión de diversas citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-17 (Gaffen, 2011; Pope *et al.*, 2000); las citoquinas están relacionadas con apoptosis (Ottaviani *et al.* 1997; Ottaviani *et al.* 2004; Barcia & Ramos-Martinez 2008). Estudios previos sugieren que la expresión de la citoquina IL-17 de *P. fucata* está regulada por distintos factores de transcripción, entre ellos C/EBP (Gaffen, 2011; S.-Z. Wu *et al.*, 2013), lo mismo ocurre con la IL-17 de *C. gigas* (Li *et al.*, 2014). Además C/EBPs participan en la regulación de LITAF (Factor TNF- $\alpha$  inducido por lipopolisacáridos) en vieiras *C. farreri* y ostras *C. gigas*, LITAF es un importante factor de transcripción implicado en la expresión de citoquinas inflamatorias (Park *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2007). El potenciador de unión a cajas CCAAT es uno de los genes que se expresa en la respuesta antiparasitaria de moluscos (Guillou *et al.*, 2007); su expresión aumenta en *M. mercenaria* infectada por QXP (Perrigault *et al.*, 2009). C/EBP se encuentra entre los genes de la oreja de mar *H. diversicolor* implicados en la respuesta a la infección bacteriana (K.-J. Wang *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2011).

La isoforma X1 de galectina 4 correspondió a otra de las proteínas exclusivas de hialinocitos. Las galectinas pueden modular la apoptosis celular con el objetivo de eliminar al organismo patógeno (Davicino *et al.*, 2011; Rabinovich & Gruppi, 2005; Vasta, 2009).

Entre las proteínas exclusivas de hialinocitos también se identificó la metalotioneína IV (MT-IV). Las metalotioneínas (MTs)



son una superfamilia de proteínas ricas en cisteína de bajo peso molecular con alta afinidad por metales pesados y presentes en una amplia variedad de organismos. Las MTs se han identificado como importantes reguladores tanto del estrés oxidativo como de la apoptosis (Kiningham & Kasarskis, 1998; Sato & Bremner, 1993).

Además, dos proteínas identificadas en hialinocitos que se han tratado en la sección 5.4.1, correspondiente a vías de señalización, también pueden tener conexión con la apoptosis. Una de ellas es la integrina  $\zeta$  D, pues se ha caracterizado una  $\zeta$ -integrina en hemocitos de *C. gigas* implicada en procesos de apoptosis y adhesión hemocitaria (Terahara *et al.*, 2006). La otra es la subunidad 4 reguladora de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) pues una de las vías principales de señalización mediadas por la integrina en la fagocitosis es la vía PI3K, que conduce a la activación de la familia Rho GTPasas (Berton & Lowell, 1999), implicadas en apoptosis.

Nuestros resultados muestran una gran variedad de proteínas implicadas en apoptosis entre los tipos hemocitarios. Estudios previos han sugerido que ambos tipos celulares podrían tener diferentes mecanismos de eliminación de partículas extrañas y patógenos (Wikfors & Alix, 2014); además, algunos estudios muestran una apoptosis más activa en granulocitos que en hialinocitos (Goedken *et al.*, 2005; Sunila & LaBanca, 2003). Nuestro estudio parece corroborar dicha idea al identificar un número mucho mayor de proteínas relevantes en procesos apoptóticos en granulocitos (13) que en hialinocitos (6).

### **5.4.3 Proteínas identificadas implicadas en reconocimiento**

El reconocimiento inmune juega un papel de vital importancia en el sistema inmunológico al discriminar lo propio de sustancias no propias, paso esencial en la activación de una respuesta inmune coordinada y eficaz, sobre todo en organismos que carecen de inmunidad adaptativa (Song *et al.* 2010). En nuestro estudio se han



identificado 9 proteínas implicadas en reconocimiento, 2 correspondientes a proteínas exclusivas de granulocitos y 6 correspondientes a proteínas exclusivas de hialinocitos.

Una de las proteínas exclusivas de granulocitos correspondía a la molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM1). CEACAMs son receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) (Chen *et al.*, 2015) que contribuyen a la adhesión célula-célula (Hammarström, 1999). Se ha documentado que, en humanos, existen CEACAMs que se expresan en granulocitos y son capaces de unirse a patógenos proporcionando una respuesta inmune innata para controlar la infección (Schmitter *et al.*, 2004).

Otra proteína específica de granulocitos correspondió a la proteína de reconocimiento de peptidoglicano SC2. Las proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (PGRPs) son PRRs importantes presentes en todos los metazoos y capaces de unirse específicamente con peptidoglicano (PGN), componente principal de las paredes celulares bacterianas y ausente en células eucariotas (Royet & Dziarski, 2007). La proteína de reconocimiento de peptidoglicano SC2 se ha encontrado entre los genes de almejas implicados en respuestas inmunes y situaciones de estrés (Husmann *et al.*, 2014) y como una de las moléculas inmunes de invertebrados marinos (Xue *et al.*, 2015).

En hialinocitos se identificó la isoforma X1 de galectina 4. Las galectinas son una familia de lectinas de unión específica a azúcares  $\beta$ -galactósido y son probablemente la familia más conservada y ubicua de lectinas que se encuentran en organismos multicelulares (Janeway & Medzhitov, 2002; Medzhitov & Janeway, 2002). Las galectinas se consideran un componente importante de la inmunidad de ostras (Guo *et al.*, 2015). Las galectinas son capaces de unirse a los glicanos presentes en la superficie de microorganismos y favorecer la entrada de patógenos dentro de las células del hospedador, entre ellas las células fagocíticas (Tasumi & Vasta, 2007). El nivel de expresión de galectina aumentó significativamente en los hemocitos de *O. edulis* al enfrentarse *in vitro* a *B. ostreae*, lo que sugiere la participación de la

galectina de ostras en el proceso de internalización del parásito, facilitando su unión a la superficie de la célula hospedadora (Morga *et al.*, 2011b). Las galectinas de la ostra plana europea parecen estar implicadas en el reconocimiento de *B. ostreae* por los hemocitos (Morga *et al.*, 2011a; Prado-Alvarez *et al.*, 2015). Por tanto, las galectinas facilitan la fagocitosis de *B. ostreae* por parte de los hemocitos de *O. edulis* aunque una vez que el parásito se ha introducido en el hemocito, éste no consigue destruirlo. También se han identificado en ostras *C. gigas* (Yamaura *et al.*, 2008), en cuyo genoma se detectaron 14 genes galectina (G. Zhang *et al.*, 2012). En *C. virginica* se demostró que las galectinas reconocen varios microorganismos, entre ellos al parásito *P. marinus* (Tasumi & Vasta, 2007; Vasta, 2009), y se observó que su expresión disminuye después de la infección por dicho parásito (Wang *et al.*, 2010), lo que implica una posible defensa de la ostra para limitar la entrada del parásito. En la ostra perlífera *Pinctada fucata* las galectinas tienen funciones en la respuesta inmune como proteína constitutiva y proteína de fase aguda (D. C. Zhang *et al.*, 2011). Además, aunque las galectinas actúan principalmente como PRRs, también pueden actuar como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), capaces de señalar el daño tisular asociado a patógenos (Sato *et al.*, 2009).

Otra de las proteínas exclusivas de granulocitos se identificó como Histona H2A. Las histonas contribuyen a la respuesta inmune innata ya que poseen actividad antimicrobiana, su expresión aumenta en la respuesta inmune y son capaces de unirse a LPS y otros PAMPs con el objetivo de eliminar patógenos (Nikapitiya & Dorrington, 2013). Diversos estudios muestran que las histonas están implicadas en el sistema inmune de moluscos bivalvos; por ejemplo su expresión aumenta en almejas infectadas por parásitos del género *Perkinsus* (Soudant *et al.*, 2013). La histona H4 podría estar implicada en la defensa de la ostra *C. virginica* contra la actividad bacteriana (Dorrington *et al.*, 2011). La histona H2A tiene potencial de péptido antimicrobiano (AMP) (C. Li *et al.*, 2007). En varios moluscos se han documentado cambios en la expresión de H2A relacionadas con diversas patologías, es el caso de la ostra *O. edulis* afectadas por neoplasia diseminada (Martín-Gómez *et al.*, 2013) y las almejas *M. arenaria*

con una infección bacteriana (Araya *et al.*, 2010) y *R. philippinarum* parasitadas por *P. olsenii* (Kang *et al.*, 2006).

Otra de las proteínas exclusivas de hialinocitos se identificó como dominio 10 similar al factor de crecimiento epidérmico múltiple (MEGF10). El dominio del factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un módulo de proteínas ampliamente distribuido, que juega un papel general en eventos extracelulares tales como la adhesión, la coagulación y las interacciones receptor-ligando (Campbell & Bork, 1993). La expresión de dominios similares al factor de crecimiento epidérmico múltiple (MEGF) aumenta en ostras *O. edulis* afectadas por bonamiosis (Martín-Gómez *et al.*, 2012) y en almejas *M. mercenaria* en respuesta a la infección por QPX (Wang *et al.*, 2016). Un tipo de EGF se sobreexpresa en almejas *R. decussatus* parasitadas por *P. olsenii* (Prado-Alvarez *et al.*, 2009a). MEGF está implicado en la interacción de *C. virginica* con bacterias (McDowell *et al.*, 2014) y MEGF10 se sobreexpresa en *C. gigas* infectadas por OsHV-1 (Renault *et al.*, 2011). Además, MEGF10 se considera un receptor relacionado con el sistema inmune de ostras (Chen *et al.*, 2015); se ha descubierto un receptor EGF que funciona en la cicatrización de heridas y promueve la proliferación celular en *C. gigas* (L. Sun *et al.*, 2014).

También en hialinocitos se identificó la miticina C. Miticina C es un péptido antimicrobiano (AMP); los AMPs forman parte de la defensa del organismo participando en el reconocimiento de patógenos (Canesi *et al.*, 2002b; Tiscar & Mosca, 2004).

Además, dos proteínas identificadas en hialinocitos que ya se han tratado en la sección 5.4.1, correspondiente a vías de señalización, también pueden tener conexión con reconocimiento. Una de ellas es la isoforma de la integrina  $\beta$  D pues las integrinas pertenecen a una familia de receptores transmembrana que son responsables de procesos de adhesión y desplazamiento celular (Tyrer *et al.*, 2006). La otra es la proteína 4 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDR4) pues los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) son receptores de superficie celular implicados en la

captura de una gran diversidad de lipoproteínas de baja densidad (Gotthardt *et al.*, 2000).

En nuestro estudio, por tanto, se han identificado diferencias en la expresión de proteínas implicadas en reconocimiento entre los dos tipos hemocitarios; estudios previos demuestran que ambos tipos celulares son capaces de reaccionar de manera distinta frente a varios tipos de estrés, incluso de diferenciar entre especies de patógenos (H. Li *et al.*, 2008); tiene sentido pensar que en esta diferenciación estén implicadas diversas moléculas de reconocimiento. Por otro lado hay autores que creen que las diferencias en la capacidad fagocítica entre granulocitos e hialinocitos pueden estar relacionadas con la naturaleza de las partículas fagocitadas y con una fagocitosis basada en receptores de iniciación (Hine, 1999; López *et al.*, 1997a; Terahara *et al.*, 2006; Evariste *et al.*, 2016), donde el reconocimiento de dichas partículas sería esencial.

El número de proteínas identificadas que participan en procesos de reconocimiento fue mayor en hialinocitos, entre ellas se han encontrado proteínas como Isoforma X1 de galectina 4 o MEGF10 que parecen participar en señalización del daño tisular y cicatrización de heridas. Hay estudios previos que sugieren que los hialinocitos están más especializados en agregación y reparación de heridas (Ruddell, 1971; Suzuki *et al.*, 1991). En nuestro estudio sólo se identificaron proteínas implicadas en dichos procesos en los hialinocitos.

#### **5.4.4 Proteínas identificadas implicadas en procesos redox**

Bajas concentraciones de ROS son necesarias e incluso indispensables en la transducción de señales y en la defensa contra microorganismos; ya que participan en la eliminación de partículas extrañas como patógenos. Sin embargo, una producción excesiva de ROS conlleva un estrés oxidativo y pérdida de funcionalidad celular (Apel & Hirt, 2004), por lo que existen mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo mediante la interacción de una red de enzimas antioxidantes en las propias células del molusco. En nuestro estudio se

identificaron 8 proteínas implicadas en procesos redox, 5 correspondientes a proteínas exclusivas de granulocitos y 3 correspondientes a proteínas exclusivas de hialinocitos.

En granulocitos se ha identificado la subunidad 1 de la citocromo C oxidasa, dicha proteína está involucrada en la cadena de transporte de electrones, una de las mayores fuentes celulares de energía y de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Raha *et al.*, 2000). No hay duda de que la cadena respiratoria mitocondrial juega un papel fundamental en la respuesta inmune de moluscos (Coyne, 2011; Van Rensburg & Coyne, 2009). En almejas se han observado variaciones en la expresión de la subunidad I de la citocromo C oxidasa en respuesta a la infección por parásitos *P. olseni* (Kang *et al.*, 2006; Prado-Alvarez *et al.*, 2009a) y QPX (Perrigault *et al.*, 2009). *P. marinus* aumenta la expresión de citocromo C oxidasa, subunidad 1 de *C. gigas* (Tanguy *et al.*, 2004). En la ostra perlífera *P. martensii*, la citocromo C oxidasa está implicada en la respuesta inmune a la infección bacteriana (Y. Wang *et al.*, 2012). En *O. edulis* la expresión de la citocromo C oxidasa varía en respuesta a bonamiosis y con la neoplasia diseminada (Martín-Gómez *et al.*, 2013, 2012); en nuestro estudio se comprobó que dicha proteína presenta una expresión condicionada por la presencia del parásito *B. ostreae* (apartado 3.4.8). Se ha observado que *B. ostreae* se multiplica con mayor éxito en el interior de hialinocitos que de granulocitos (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a); podría pensarse que la citocromo C oxidasa, entre otras proteínas, podría conferir a los granulocitos mayor capacidad inmunológica.

Dos proteínas exclusivas de granulocitos se identificaron como quelato férrico reductasa 1 e isoforma X1 de quelato férrico reductasa 1. La quelato férrico reductasa 1 es una transferrina oxidorreductasa que contribuye a la defensa del huésped mediante el control del suministro de micronutrientes esenciales en la vecindad de los sitios de infección, reduciendo así la supervivencia del parásito (Ong *et al.*, 2006; Stafford *et al.*, 2013). El gen quelato férrico reductasa 1 es uno de los genes cuya expresión aumenta en *M. mercenaria* en respuesta a la infección por QPX (Wang *et al.*, 2016).

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* mediante el procedimiento de “shotgun”

Además, dos proteínas identificadas en granulocitos que ya se han tratado en la sección 5.4.1, correspondiente a vías de señalización, también pueden tener conexión con procesos redox. Una de ellas es la proteína G de unión a nucleótidos de guanina subunidad  $\alpha$ , que participa en reacciones celulares redox en ostras *Crassostrea hongkongensis* (Luo *et al.*, 2014). La otra es el factor inducible de hipoxia-1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ); HIF-1 actúa como factor de transcripción, regulador clave de la homeostasis del oxígeno en los organismos aeróbicos bajo hipoxia (Wang *et al.*, 1995). HIF-1 controla la expresión de genes clave en la defensa antioxidante celular (Semenza, 2007). HIF-1 es uno de las principales proteínas de respuesta al estrés en bivalvos marinos (Q. Li *et al.*, 2013). En ostras, la participación de HIF-1 en la regulación de la expresión génica ante situaciones de estrés se ha documentado (David *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2015; Ivanina *et al.*, 2010; Kawabe & Yokoyama, 2012). Se ha demostrado que HIF-1 $\alpha$  desempeña un papel crítico en la producción de ROS en los hemocitos de *C. gigas* (Choi *et al.*, 2013).

Entre las proteínas exclusivas de hialinocitos se identificó la proteína 2 similar a monooxigenasa que contiene flavina FMO GS-OX; las FMOs catalizan la oxigenación de una amplia variedad de xenobióticos (Schlenk & Buhler, 1989). La detección de la actividad FMO en bivalvos sugiere que este sistema juega un papel clave en la detoxificación de estos organismos (Boutet *et al.*, 2004b). La expresión de FMO aumenta en *C. gigas* tras una exposición a hidrocarburos (Boutet *et al.*, 2004a). En la misma especie FMO participa en el metabolismo del nitrógeno (Tanguy *et al.*, 2005b).

Una de las proteínas exclusivas de hialinocitos se identificó como metalotioneína IV (MT-IV). Se han atribuido diversas funciones a las MTs, tales como homeostasis y detoxificación en respuesta a metales y captura de radicales libres; se ha observado la activación de genes MT inducida por radicales de oxígeno (Kiningham & Kasarskis, 1998; Sato & Bremner, 1993), lo que puede explicar la posible participación de MT en el sistema de defensa antioxidante celular. En *C. virginica* la expresión de distintas metalotioneínas aumenta en respuesta a la infección por *P. marinus* (Wang *et al.*, 2010); su expresión también



aumenta en *M. mercenaria* infectada por QPX (Perrigault *et al.*, 2009). En *C. gigas* las MTs están relacionada con la resistencia de la ostra a la mortalidad estival (David *et al.*, 2012; Fleury & Huvet, 2012) y aumentan su expresión tras una infección bacteriana (de Lorgeril *et al.*, 2011). Por tanto, las metalotioneínas están claramente implicadas en el sistema defensivo de bivalvos, concretamente en la inmunidad de los hemocitos de ostra (Anderson *et al.*, 1999).

Otra proteína específica de hialinocitos fue la subunidad 4 reguladora de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). PI3K tiene un papel relevante en estallido respiratorio y en la producción de NO en los hemocitos (García-García *et al.*, 2008). En *M. galloprovincialis* PI3K participa en la regulación de la producción de ROS por diferentes tipos hemocitarios (García-García *et al.*, 2008).

Nuestros resultados muestran varias proteínas implicadas en procesos de oxidación-reducción cuya expresión difiere entre los tipos hemocitarios, sugiriendo que ambos tipos celulares participan de manera distinta en procesos como producción de ROS/ RNS, y respuesta al estrés oxidativo. Se cree que granulocitos e hialinocitos son capaces de producir ROS y RNS distintos (Donaghy *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2013; Lambert *et al.*, 2003). En general es asumida la idea de que la actividad oxidativa a través de la producción de ROS es más elevada en granulocitos que en hialinocitos (Donaghy *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2013; Lambert *et al.*, 2007, 2003; Wang *et al.*, 2017). De forma coherente con esta idea, en nuestro estudio se han identificado más proteínas relacionadas con procesos redox en granulocitos que en hialinocitos. Otros estudios han observado que los hialinocitos son capaces de producir especies de nitrógeno más reactivas (RNS) que los granulocitos (Kalyanaraman *et al.*, 2012; Lambert *et al.*, 2007).

#### **5.4.5 Proteínas identificadas implicadas en citoesqueleto**

El citoesqueleto desempeña un papel central en muchas funciones celulares, regulando la forma de las células, la división celular, la adhesión, la motilidad, la migración, la transducción de señales y la fagocitosis, que son elementos cruciales en los mecanismos de defensa



(May & Machesky, 2001). De las proteínas identificadas en nuestro estudio relacionadas con citoesqueleto, 3 proteínas correspondieron a proteínas exclusivas de granulocitos y 2 a proteínas exclusivas de hialinocitos.

Una de las proteínas exclusivas de granulocitos se identificó como la subunidad 1A de la proteína 2/3 relacionada con actina. La actina es una proteína implicada en diversas funciones relacionados con el citoesqueleto como morfología, división celular, movimiento de orgánulos y vesículas, locomoción, fagocitosis, endocitosis y exocitosis (Kabsch & Vandekerckhove, 1992; May & Machesky, 2001; Rubenstein, 1990), procesos de gran importancia en la respuesta inmune.

Además, dos proteínas identificadas en granulocitos que ya se han tratado en las secciones previas 5.4.1 o 5.4.2. también tienen conexión con procesos redox. Una de ellas es la isoforma X4 de la proteína 1 que interactúa con huntingtina (HIP1); HIP1 parece estar involucrada en el transporte de aminoácidos y el ensamblaje del citoesqueleto (Zhao *et al.*, 2016). La otra es la proteína 44 activadora de Rho GTPasa, parcial, que está implicada en la organización del citoesqueleto, fagocitosis y adhesión (Hall, 1994; Lacal, 1997; Mulloy *et al.*, 2010).

En el caso de hialinocitos, una de las proteínas exclusivas correspondió a la isoforma X7 de filamina A. Las filaminas son proteínas de unión a actina implicadas en organización del citoesqueleto y en señalización (Stossel *et al.*, 2001). Se han observado genes filamina sobreexpresados en los hemocitos de *O. edulis* en contacto con *B. ostreae* (Morga *et al.*, 2011a; Prado-Alvarez *et al.*, 2015) y en *Octopus vulgaris* infectada por el parásito *Aggregata octopiana* (Castellanos-Martínez *et al.*, 2014b).

Otra de las proteínas exclusivas de hialinocitos fue la isoforma X1 de espectrina cadena  $\alpha$ . La espectrina es una proteína de unión a actina, componente principal de un sistema de proteínas estructurales asociadas con la superficie citoplasmática de las membranas plasmáticas de la mayoría de células (Bennett & Gilligan, 1993),

contribuyendo a la vinculación entre la membrana plasmática y el citoesqueleto (Röper *et al.*, 2002). Se ha establecido que las proteínas que comprenden dominios de espectrina juegan un papel importante en el desarrollo o iniciación de la respuesta inmune (Mosavi & Cammett, 2004); recientemente dichos dominios se describieron con una elevada importancia en la inmunidad innata de moluscos (Picone *et al.*, 2015). El citoesqueleto de espectrina-actina junto con las anquirinas (proteínas que también se han identificadas exclusivamente en hialinocitos) juega papeles clave en actividades tales como motilidad celular, activación, proliferación, contacto y mantenimiento de dominios especializados de membrana (Bennett & Chen, 2001).

Nuestros resultados muestran que la expresión proteica de granulocitos e hialinocitos también varía en proteínas relacionadas con el citoesqueleto. Numerosos estudios han encontrado diferencias en funciones del citoesqueleto entre los tipos hemocitarios de bivalvos (Cajaraville & Pal, 1995; Fisher, 1988; López *et al.*, 1997a; López *et al.*, 1997c; Chu, 2000; Terahara *et al.*, 2006; Kuchel *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2013; Wikfors & Alix, 2014). Los granulocitos se consideran el tipo celular con mayor actividad fagocítica (Cajaraville & Pal, 1995; Fisher, 1988; Carballal *et al.*, 1997c; López *et al.*, 1997a; Chu, 2000; Kuchel *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2013); considerando en conjunto las proteínas identificadas en nuestro estudio relacionadas con citoesqueleto y las relacionadas con transducción de señales asociadas a la fagocitosis, reconocimiento de patógenos para ser fagocitados y destrucción de patógenos a través de fagocitosis, se han identificado más proteínas relacionadas con fagocitosis en granulocitos que en hialinocitos, lo que podría tener relación con la mayor actividad fagocítica de este tipo celular. Además se han encontrado diferencias en la locomoción entre los tipos celulares de ostra (Kuchel *et al.*, 2010), a lo que estas proteínas expresadas de manera diferente entre granulocitos e hialinocitos también podrían contribuir. Todos los procesos de fagocitosis se llevan a cabo mediante la reorganización del citoesqueleto de actina (May & Machesky, 2001), por tanto diferencias en las actinas presentes entre granulocitos e hialinocitos sugieren procesos fagocíticos diversos entre los tipos hemocitarios, este hecho concuerda

con estudios anteriores (López *et al.*, 1997a; Terahara *et al.*, 2006). Cabe destacar la proteína  **$\beta$ -integrina** tiene un interés especial puesto que en *C. gigas* se ha demostrado que la fagocitosis de hialinocitos está regulada por un mecanismo dependiente de integrina, sugiriendo que los granulocitos podrían poseer otros receptores para llevar a cabo este papel (Terahara *et al.*, 2006). Nuestros resultados concuerdan con este hecho ya que se ha identificado esta proteína únicamente en hialinocitos. Se ha propuesto que las diferencias en la capacidad fagocítica entre tipos hemocitarios puede estar relacionada con la naturaleza de las partículas fagocitados y con una fagocitosis basada en receptores de iniciación (Evariste *et al.*, 2016; Hine, 1999; López *et al.*, 1997a; Terahara *et al.*, 2006).

#### **5.4.6. Proteínas identificadas implicadas en otras funciones inmunes**

Algunas de las proteínas identificadas están también implicadas en otras funciones diferentes a las mencionadas en las secciones precedentes de la discusión. Es el caso de la cistatina A2, pues las cistatinas están implicadas en coagulación y activación del complemento (Iwanaga *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999; Vasta *et al.*, 1999). La quelato férrico reductasa favorece la producción de factores antimicrobianos (Y. Sun *et al.*, 2014). También es el caso de la serina proteasa mitocondrial (HtrA2) pues las serina proteasas están implicadas en la activación de la cascada del complemento (Rawlings & Barrett, 1993) y la activación del sistema profenoloxidasa (Aladaileh *et al.*, 2007a; Cong *et al.*, 2005; Hellio *et al.*, 2007). Las C/EBPs son factores de transcripción que regulan la expresión de diversas citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-17 (Gaffen, 2011; Pope *et al.*, 2000). La miticina C es un péptido antimicrobiano (AMP); los AMPs poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas, con el objetivo de conseguir la destrucción del invasor a través de la opsonización o por destrucción directa (Canesi *et al.*, 2002b; Tiscar & Mosca, 2004). La miticina C tiene una alta variabilidad polimórfica en bivalvos y se le atribuyen, además, funciones quimiotácticas e inmunorreguladoras (Costa *et al.*, 2009a; Balseiro *et al.*, 2011).



## **6 COMPARACIÓN DEL PROTEOMA DE GRANULOCITOS E HIALINOCITOS DE *Ostrea edulis* AL ENFRENTARLOS "IN VITRO" A INDUCTORES DE RESPUESTA INMUNE**

### **6.1 INTRODUCCIÓN**

A diferencia de los vertebrados con un sistema inmune adaptativo capaz de producir una enorme diversidad de anticuerpos específicos que les confiere memoria inmunológica por periodos muy prolongados para destruir patógenos de forma específica, las ostras y el resto de invertebrados, generalmente de vida más corta, carecen de mecanismos de memoria inmunológica tan sofisticados y poseen un sistema inmune más comparable al sistema inmune innato de los vertebrados. Como filtradores bentónicos, las ostras están expuestas a una gran variedad de patógenos. El hecho de que las ostras, carentes de inmunidad adaptativa, puedan sobrevivir en un entorno marino tan rico en patógenos sugiere que estos organismos tienen un sistema inmune innato eficaz, aun siendo más genérico (menos específico) que el de vertebrados. Su sistema inmune se basa en relativamente pocos receptores que pueden reconocer patrones moleculares asociados a un amplio número de organismos patógenos y activar respuestas tanto celulares como humorales. Las respuestas celulares incluyen la movilización y el reclutamiento de hemocitos en el sitio de la infección, y la fagocitosis. Los hemocitos son un órgano primario en

la respuesta inmune de la ostra; su acción junto con las respuestas humorales, que incluyen citoquinas, enzimas y otros efectores inmunes, conduce a la destrucción de los organismos invasores y sus componentes (Guo *et al.*, 2015).

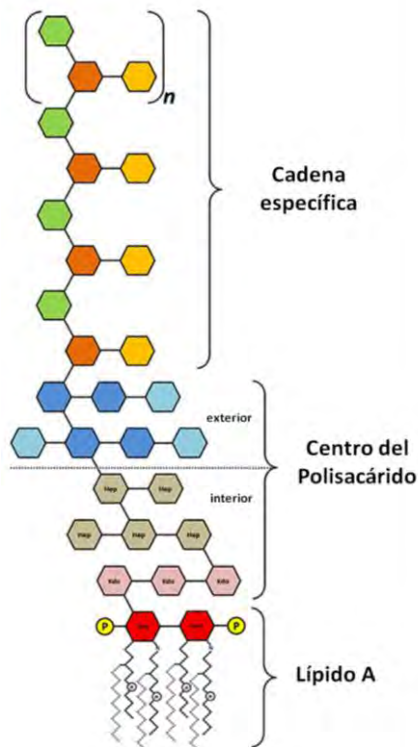
Por tanto, el sistema inmune de los moluscos, primera línea de defensa contra los agentes patógenos, es capaz de reconocer estructuras comunes presentes en los microorganismos, conocidos como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*) (PAMPs) a través de Receptores de Reconocimiento de Patrones (*Pattern recognition receptors*) (PRRs) (Medzhitov & Janeway, 2002). El ácido lipoteicoico (LTA) de las bacterias Gram positivas, el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas y el DNA (CpG) (regiones con una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos) procedente de bacterias; el zymosan y los  $\beta$ -glucanos de levaduras y el ácido Poliinosínico: policitidílico (Poly I:C), ARN sintético de cadena doble que permite simular la infección de un virus, son algunos ejemplos de estructuras que funcionan como PAMPs activando una respuesta inmune que tiene como objetivo la eliminación del patógeno invasor (Aderem & Ulevitch, 2000). En estudios inmunológicos es frecuente el uso de diferentes PAMPs para provocar y analizar una respuesta inmune sin utilizar microorganismos vivos; en el presente estudio se han utilizado partículas inertes de LPS, Poly I:C y Zymosan con el objetivo de provocar en el sistema inmune de *O. edulis* reacciones antibacterianas, antivíricas y antifúngicas, respectivamente.

### 6.1.1 Lipopolisacáridos (LPS)

El lipopolisacárido o LPS es el principal componente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas y actúa como un fuerte estimulador de la inmunidad innata o natural en diversas especies eucarióticas, desde insectos a humanos (Lien *et al.*, 2000; Pipe *et al.*, 1997). El LPS (Figura 1) es un polisacárido hidrofílico que contiene una porción hidrofóbica (lípidos A) altamente conservada (Ulevitch & Tobias, 1995). El lípidos A representa el centro

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune

inmunoreactivo del LPS debido a la especificidad y al reconocimiento altamente sensible de la estructura lipídica por numerosos componentes celulares y humorales de la inmunidad innata; dicho reconocimiento da lugar a una gran variedad de respuestas biológicas (Hoffmann *et al.*, 1999; Medzhitov & Janeway, 2000, 1998). LPS es capaz de activar macrófagos de vertebrados (Celada & Nathan, 1994;



**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura general de los LPS (Imagen adaptada de Serrato 2014).

diferentes cascadas de transducción de señales implicadas en inmunidad innata en hemocitos de mejillón (Betti *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2004a, 2004b).

En diversas especies de ostras se ha demostrado que LPS aumenta la expresión de la enzima superóxido dismutasa (SOD),

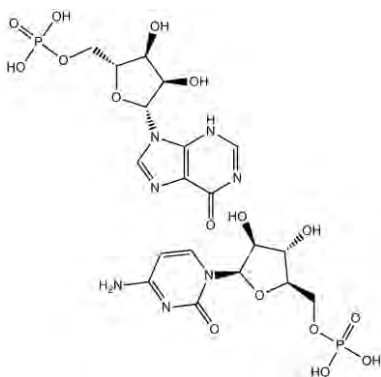
Chen *et al.*, 2003; Khadaroo *et al.*, 2003; Stout *et al.*, 2005) y hemocitos de invertebrados (Ottaviani *et al.*, 1995). Al activar macrófagos, se desencadena la secreción, entre otros, de óxido nítrico (NO) (Ottaviani *et al.*, 1997), citoquinas (Weiss *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005) y la activación de múltiples señales de transducción en las que están implicadas fosfolipasas, proteínas G, proteína quinasas, etc. (Liu *et al.*, 1994; Sweet & Hume, 1996; von Knechten *et al.*, 2005). Al igual que en vertebrados, los hemocitos de invertebrados responden a la acción del LPS mediante cambios conformacionales, incremento de la movilidad y liberación de óxido nítrico (Hughes *et al.*, 1991a; Hughes *et al.*, 1991b; Lowenstein *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1993). Se ha demostrado que el LPS bacteriano es capaz de activar



desencadenando una serie de respuestas inmunes (Anju *et al.*, 2013a; Gonzalez *et al.*, 2005). Además, LPS induce la expresión de varias citoquinas, entre otras destaca el Factor TNF- $\alpha$  y la IL-17 (Park *et al.*, 2008; D. Zhang *et al.*, 2009a; Li *et al.*, 2014; Y. Zhang *et al.*, 2013b; Yu *et al.*, 2012) y lectinas (Anju *et al.*, 2013b). En la ostra *Saccostrea glomerata* la inducción con LPS incrementa las actividades fagocíticas y la producción de fenoloxidasa (PO) (Aladaileh *et al.*, 2007a). En *C. gigas* LPS también es capaz de activar la cascada ProPO (Hellio *et al.*, 2007). En ostras *Pinctada fucata*, LPS activa la vía de señalización NF- $\kappa$ t (C. Li *et al.*, 2010). En la misma especie, la expresión de IRF2, regulador transcripcional que juega un papel fundamental en la inmunidad innata, aumenta tras la estimulación con LPS (X.-D. Huang *et al.*, 2013), al igual que proteínas de unión a LPS y  $\zeta$ -1,3-glucanos (LGBPs) (D. Zhang *et al.*, 2010). En *O. edulis* la administración de LPS induce un incremento del número de granulocitos circulantes y de la actividad lisoenzimática (Prado-Alvarez *et al.*, 2015).

### 6.1.2 Ácido Poliinosínico: policitidílico (Poly I:C)

Poly I:C es un compuesto sintético de ARN de doble cadena (dsRNA) (Figura 2) que permite simular una infección vírica, ya que casi todos los virus producen ARN de doble cadena en algún momento durante su replicación (Randall & Goodbourn, 2008). Se ha constatado que el enfrentamiento con el inductor Poly I:C desencadena una respuesta inmune en diferentes moluscos (De Zoysa



**Figura 2.** Representación esquemática de la estructura general de Poly I:C.

(Imagen obtenida de <http://www.apexbt.com//media/diy/images/struct/B5551.png>)

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune

& Lee, 2007; Fernandez-Trujillo *et al.*, 2008; Pallavicini *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009b; Wang *et al.*, 2009b; Wu *et al.*, 2010 Green *et al.*, 2015a; He *et al.*, 2015).

Varios estudios demuestran el efecto de Poly I:C en la inmunidad de las ostras (Luo *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012; Green & Montagnani, 2013; S. Z. Wu *et al.*, 2013; X. D. Huang *et al.*, 2013; Y. Y. Zhang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Green *et al.*, 2014a, 2014b, 2015a, 2015b, 2016a, 2016b; Lafont *et al.*, 2017; Masood *et al.*, 2016, 2017; Pauletto *et al.*, 2017; Green & Speck, 2018). Las ostras son capaces de reconocer estos patrones moleculares asociados a virus como Poly I:C (Green & Barnes, 2009) desencadenando una respuesta inmune que activa cascadas de señalización y regula la expresión de efectores moleculares capaces de inhibir la entrada del virus en el organismo o su replicación (Green & Montagnani, 2013). Poly I:C regula positivamente la expresión de receptores de reconocimiento viral, moléculas de señalización y efectores antivirales semejantes a los de vertebrados en hemocitos de *C. gigas* (Green *et al.*, 2014b). Además Poly I:C puede activar la vía de Rel/NF- $\kappa$  en *S. glomerata* (Green & Barnes, 2009), la expresión de IL-17 y factores de regulación de interferon en *Pinctada fucata* (X.-D. Huang *et al.*, 2013; S.-Z. Wu *et al.*, 2013) y participa en la regulación de TNF- $\alpha$ , IL-17 y receptores de ARNs y ADNs víricos en *C. gigas* (Green *et al.*, 2014b; Li *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2012; Y. Y. Zhang *et al.*, 2014).

### 6.1.3 Zymosan A

El Zymosan A se prepara a partir de paredes celulares de levadura y consiste en complejos de proteínas y carbohidratos. El Zymosan se ha utilizado como un inductor del estallido respiratorio en muestras de hemolinfa de moluscos por gran número de autores (Anderson, 1994; Kumazawa *et al.*, 1993; Torreilles *et al.*, 1999; Wootton *et al.*, 2003) y ha sido considerado el estimulante más potente del estallido respiratorio (Costa *et al.*, 2008; Ordás *et al.*, 2000). Su eficiencia para provocar la producción de ROS en el interior de los hemocitos se ha demostrado en diversos moluscos (Oyanedel *et al.*, 2016), entre otros en ostras *O. edulis* (Aladaileh *et al.*, 2007a; Hégaret *et al.*, 2003;

Lambert *et al.*, 2003; Xue *et al.*, 2001). En *O. edulis* y en *C. gigas*, Zymosan induce procesos de fagocitosis (Bachère *et al.*, 1991). En la ostra *Saccostrea glomerata* la estimulación con Zymosan incrementa las actividades fagocíticas y la producción de fenoloxidasa (Aladaileh *et al.*, 2007a). En *C. gigas* Zymosan también aumenta la actividad fenoloxidasa (Hellio *et al.*, 2007). En *O. edulis* la administración de Zymosan induce un incremento del número de granulocitos circulantes y de la actividad lisoenzimática (Prado-Alvarez *et al.*, 2015).

#### **6.1.4. Objetivos**

Este capítulo tiene como objetivo profundizar en el estudio de las diferencias en capacidad inmune entre los tipos hemocitarios de *O. edulis*, en este caso analizando los proteomas de los tipos hemocitarios tras enfrentarlos *in vitro* a diversos PAMPs, como vía experimental de simular el enfrentamiento a bacterias, virus y hongos.

## **6.2 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.2.1 Material biológico**

Para realizar los experimentos de separación hemocitaria se utilizaron ostras "naive" en relación con la bonamiosis, ostras de una población que no ha estado en contacto con *Bonamia spp.*, en concreto de Limfjord, Dinamarca. Las ostras vivas se transportaron a las instalaciones del CIMA y se mantuvieron en tanques de 30L, con flujo continuo de agua salada de la Ría de Arousa hasta el momento de su utilización. Aproximadamente, ciento cincuenta ostras fueron usadas en los ensayos con cada inductor, en todos los casos los animales procedían de la misma zona y habían permanecido bajo las mismas condiciones.

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune

### **6.2.2 Obtención de muestras de hemolinfa**

La hemolinfa se obtuvo por extracción directa del músculo aductor siguiendo el procedimiento que se explica en el apartado 4.2.2 de este trabajo.

### **6.2.3 Separación hemocitaria y observación de la morfología de los hemocitos**

La separación de las células de la hemolinfa de *O. edulis* y su posterior observación se realizaron exactamente como se describe en los apartados 4.2.3 y 4.2.4. Tanto la separación hemocitaria como la posterior evaluación de la morfología de los hemocitos para asegurar una correcta separación y viabilidad celular se realizó repetidamente hasta conseguir  $20 \times 10^6$  de células de cada tipo hemocitario por cada inductor y tiempo de incubación. Muestras de  $20 \times 10^6$  hialinocitos y  $20 \times 10^6$  granulocitos se congelaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta su posterior utilización.

### **6.2.4 Enfrentamiento hemocitario a inductores de respuesta inmune**

Los patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs), utilizados en este experimento para inducir una respuesta en los hemocitos de *Ostrea edulis* fueron: lipopolisacáridos (LPS), ácido poliinosínico: policitídílico (Poly I:C) y Zymosan A. En todos los casos se realizó un enfrentamiento "in vitro". En ensayos previos se había estimado la necesidad de utilizar 20 millones de células en cada tratamiento para asegurar una cantidad de proteínas totales suficientes como para garantizar un análisis proteómico resolutive. Esa elevada cantidad de células de cada tipo hemocitario para cada tratamiento motivó que la incubación, con 3 tiempos diferentes de duración, de cada tipo hemocitario con cada inductor no fuese posible en algún caso, teniendo en cuenta que todos los ensayos con un mismo inductor había que realizarlos en una misma jornada de trabajo para unificar condiciones experimentales para cada inductor.

#### 6.2.4.1 Lipopolisacáridos (LPS)

En frascos de cultivo de 25 cm<sup>3</sup> se incubaron 20 millones de granulocitos y 20 millones de hialinocitos, respectivamente, en 15 mL de agua de mar filtrada (AMF) con lipopolisacárido (LPS de *Escherichia coli* O26:B6, Sigma, ref. L-8214) en una concentración de 10  $\mu$ g/ml, durante una hora, en agitación y a temperatura ambiente. El mismo número de granulocitos y de hialinocitos se incubaron en las mismas condiciones pero sin la presencia del inductor (muestras control). Tras la incubación, el contenido de cada frasco se centrifugó a 800xg, 18°C, 15 min, y el sedimento se congeló a -80°C hasta su posterior utilización para análisis proteómico (Figura 3).

#### 6.2.4.2 Ácido Poliinosínico: policitídílico (Poly I:C)

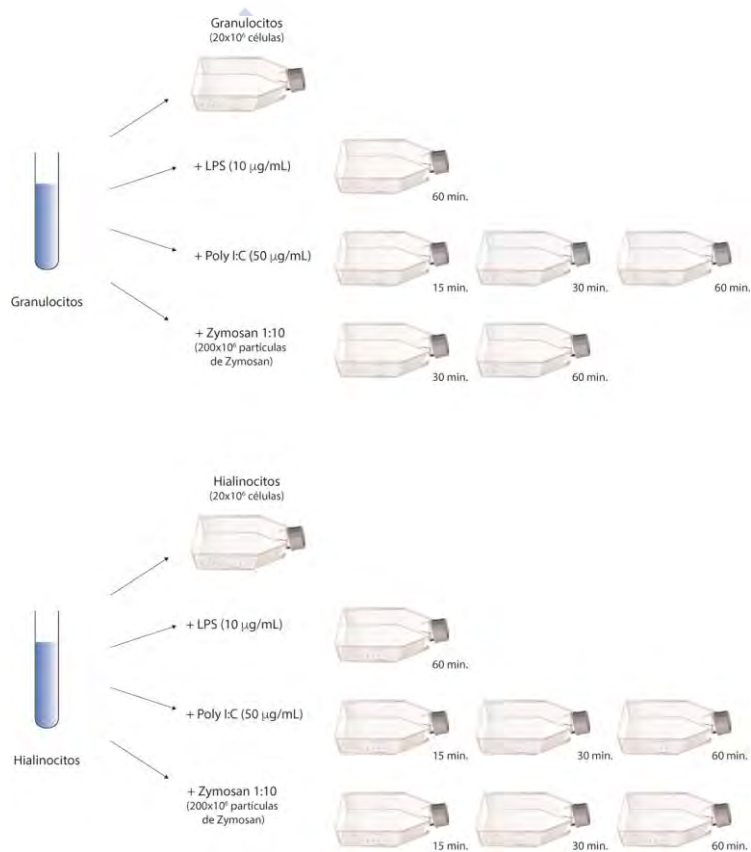
En frascos de cultivo de 25 cm<sup>3</sup> se resuspendieron 20 millones de granulocitos y 20 millones de hialinocitos en 15 mL de AMF y se incubaron con Poly I:C (Sigma, ref. P9582) en una concentración de 50  $\mu$ g/ml a temperatura ambiente con agitación continua durante 15 minutos. El proceso se repitió en ambos casos con diferentes tiempos de incubación (30 minutos y 1 hora). Como en el caso anterior, el mismo número de granulocitos y de hialinocitos se incubaron en las mismas condiciones pero sin la presencia del inductor (muestras control) durante 60 minutos. Tras la incubación, el contenido de cada frasco se centrifugó (800xg, 18°C, 15 min), el sobrenadante se eliminó y el sedimento se congeló a -80°C hasta su utilización para análisis proteómico (Figura 3).

#### 6.2.4.3 Zymosan A

Partículas de Zymosan A (Zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, ref. Z4250) se enfrentaron a granulocitos e hialinocitos con una relación 1:10 (1 hemocito: 10 partículas de Zymosan A). 20x10<sup>6</sup> células de cada tipo hemocitario se incubaron con 200x10<sup>6</sup> partículas de Zymosan A en frascos de cultivo de 25 cm<sup>3</sup> en 15 mL de AMF, con agitación, a temperatura ambiente, durante diferentes tiempos: 30 y 60 minutos en el caso de granulocitos y 15,

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune

30 y 60 minutos en el caso de hialinocitos. Como en los casos anteriores, el mismo número de granulocitos y de hialinocitos se incubaron en las mismas condiciones pero sin la presencia del inductor (muestras control) durante 60 minutos. Transcurridos cada uno de los tiempos de incubación, el contenido de cada frasco se centrifugó (800xg, 18°C, 15 min) y el sedimento con células obtenido en cada caso se congeló a -80°C para continuar con el estudio proteómico (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema representativo del enfrentamiento hemocitario a distintos inductores de respuesta inmune, indicando la concentración del inductor y el tiempo de incubación.

Una vez realizados todos los enfrentamientos, los grupos obtenidos para las comparaciones proteómicas son los que se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Lista de tratamientos incluidos en los ensayos de enfrentamiento *in vitro* de cada tipo hemocitario de *Ostrea edulis* a inductores de respuesta inmune.

Inductor	Tipo celular	Grupo
LPS	Granulocitos (G)	G Control
		G LPS 60'
	Hialinocitos (H)	H Control
		H LPS 60'
Poly I:C	Granulocitos (G)	G Control
		G Poly 15'
		G Poly 30'
		G Poly 60'
	Hialinocitos (H)	H Control
		H Poly 15'
		H Poly 30'
		H Poly 60'
Zymosan A	Granulocitos (G)	G Control
		G Zymosan 30'
		G Zymosan 60'
	Hialinocitos (H)	H Control
		H Zymosan 15'
		H Zymosan 30'
		H Zymosan 60'

### 6.2.5 Extracción proteica

La extracción proteica de las muestras se realizó como se explica en el apartado 4.2.5.

### 6.2.6 Electroforesis bidimensional 2-DE

El proceso completo de electroforesis bidimensional se realizó exactamente como se describe en el apartado 4.2.6.

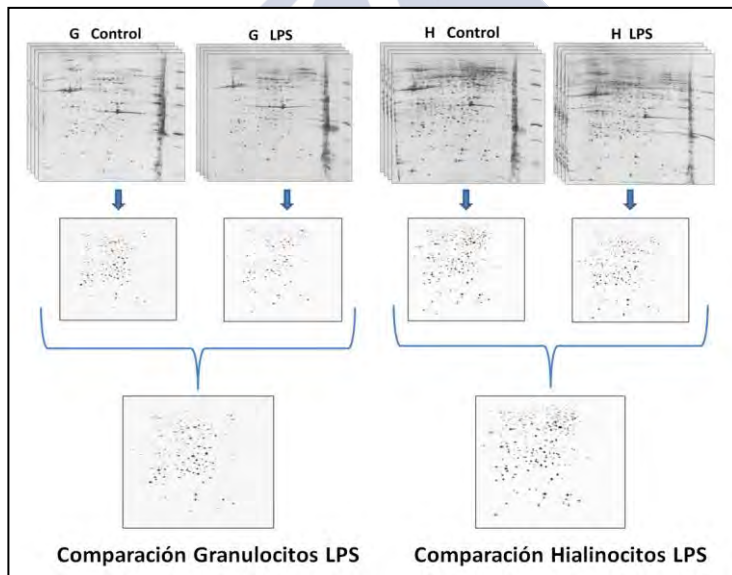


Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune

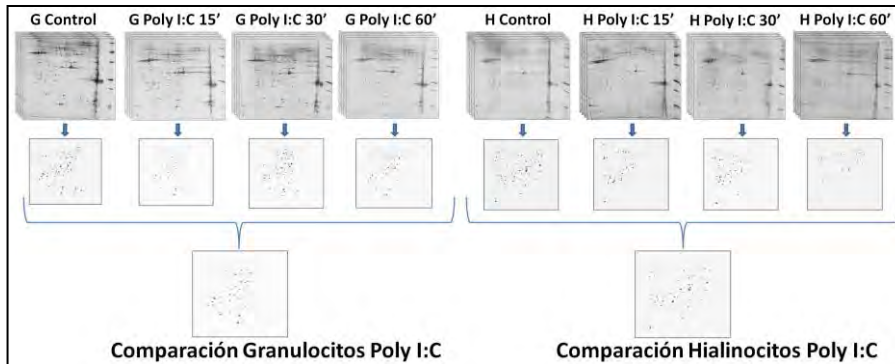
### 6.2.7 Análisis de imagen y comparativa entre geles

El análisis proteómico se realizó de manera cualitativa con el programa informático PDQuest 8.0.1 (BioRad) como se explica en el apartado 3.2.6.

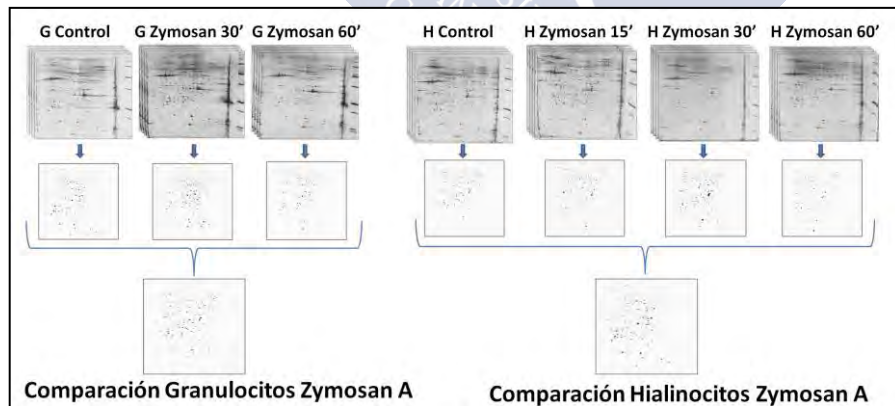
Los geles de cada tratamiento se compararon con los geles control correspondientes. La Figura 4 muestra las comparaciones correspondientes al enfrentamiento de granulocitos e hialinocitos al inductor LPS; las comparaciones correspondientes al experimento con Poly I:C se muestran en la Figura 5 y las correspondientes al enfrentamiento a Zymosan A están representadas en la Figura 6.



**Figura 4.** Esquema representativo de las distintas comparaciones entre geles llevadas a cabo con el inductor LPS. Se comparó granulocitos sin estimulación frente a granulocitos estimulados con LPS y, por otro lado, hialinocitos no estimulados frente a hialinocitos estimulados con LPS.



**Figura 5.** Esquema representativo de las distintas comparaciones entre geles correspondientes al inductor Poly I:C. Se comparó granulocitos sin estimulación frente a granulocitos incubados con el inductor durante diferentes tiempos (15, 30 y 60 minutos) y, por otro lado, hialinocitos no estimulados frente a hialinocitos incubados con inductor durante tiempos diferentes (15, 30 y 60 minutos).



**Figura 6.** Esquema representativo de las distintas comparaciones realizadas entre geles al enfrentar "in vitro" cada tipo celular al inductor Zymosan A. Se comparó granulocitos no estimulados frente a granulocitos incubados con el inductor durante 30 y 60 minutos y, por otro lado, hialinocitos no estimulados frente a hialinocitos incubados con el inductor durante 15, 30 y 60 minutos.

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune

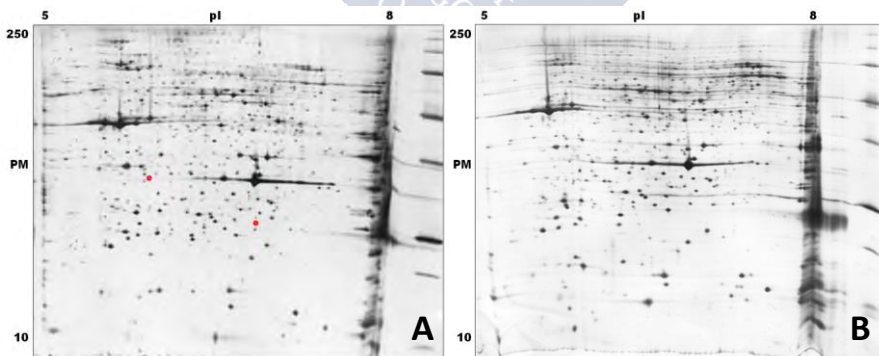
### 6.2.8 Espectrometría de masas y búsqueda en bases de datos

El análisis mediante espectrometría de masas y la búsqueda en las bases de datos se llevaron a cabo como se explica en el apartado 3.2.7.

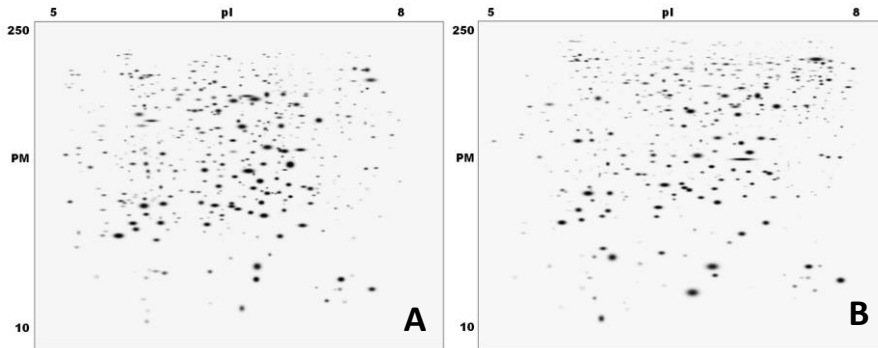
## 6.3 RESULTADOS

### 6.3.1 Estudio del efecto del enfrentamiento a LPS en el proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis*

Analizando los geles de granulocitos control y de granulocitos estimulados con LPS durante 60 minutos, se obtuvieron de media 891 marcas proteicas en granulocitos control y 1052 en el caso de granulocitos incubados con LPS (Figura 7). En el primer grupo se detectaron 494 marcas comunes a todos los geles de granulocitos control, mientras que en el segundo hubo 603 comunes a todas las réplicas (Figura 8). Al comparar ambas condiciones (granulocitos no estimulados frente a granulocitos incubados con LPS), se detectaron 409 marcas proteicas comunes a los 2 grupos, y en el caso de granulocitos control se encontraron 2 marcas exclusivas, mientras que no se detectó ninguna marca exclusiva correspondiente a granulocitos enfrentados a LPS (Figura 7).

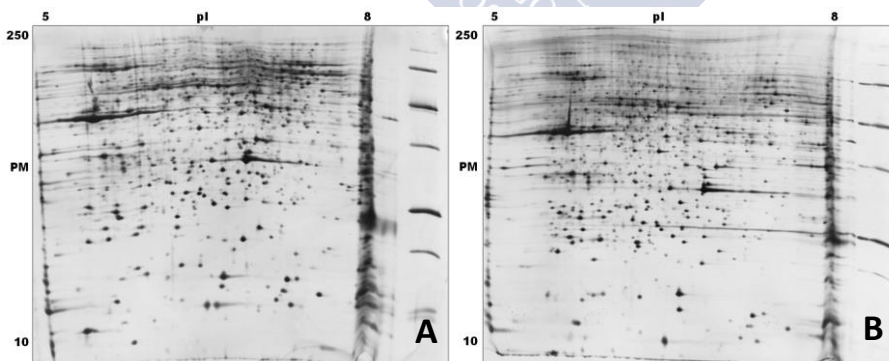


**Figura 7.** Geles representativos del patrón proteico obtenido mediante electroforesis bidimensional de los **granulocitos** de *Ostrea edulis* sin estimulación (A) y granulocitos enfrentados a LPS durante 60 minutos (B). Los círculos rojos indican las marcas exclusivas detectadas en el grupo control. pl: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.



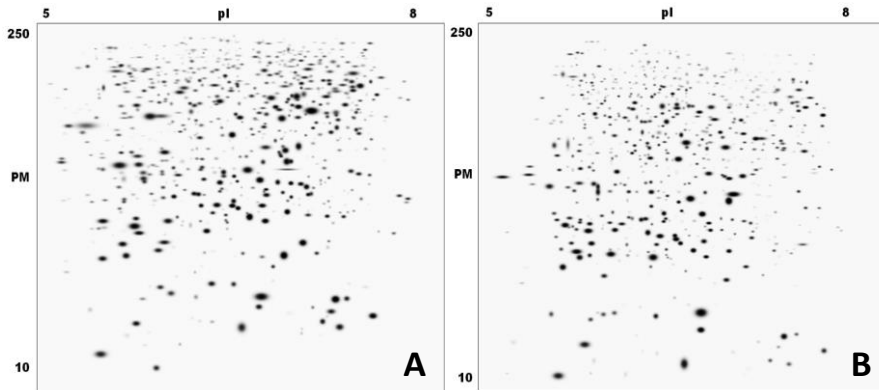
**Figura 8.** Mapas sintéticos de las marcas proteicas comunes a las cuatro réplicas de los geles de **granulocitos** de *Ostrea edulis* sin estimulación (A) y granulocitos enfrentados a LPS durante 60 minutos (B). pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.

En los geles de hialinocitos control se detectó una media 1237 marcas proteicas y de 1104 en los geles de hialinocitos incubados con LPS durante 60 minutos (Figura 9). En el primer grupo se encontraron 730 marcas comunes a las 4 réplicas y en el segundo se observaron 669 marcas comunes (Figura 10). Comparando los dos grupos (hialinocitos control frente a hialinocitos incubados con LPS) se detectaron 539 marcas proteicas presentes en ambos y no se detectó ninguna marca exclusiva de ningún grupo.



**Figura 9.** Geles bidimensionales representativos de las proteínas expresadas en los **hialinocitos** de *Ostrea edulis* sin estimulación (A) e hialinocitos enfrentados a LPS durante 60 minutos (B). pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune



**Figura 10.** Mapas sintéticos de las marcas proteicas comunes a las cuatro réplicas de los geles de hialinocitos de *Ostrea edulis* sin estimulación (A) e hialinocitos enfrentados a LPS durante 60 minutos (B). pl: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.

La comparativa de geles correspondientes a la estimulación de granulocitos e hialinocitos con LPS se resume en la tabla 2.

**Tabla 2.** Resumen del análisis de geles 2-DE correspondientes a la estimulación con LPS, donde se incluye el número medio de marcas proteicas en los 4 geles de cada tipo hemocitario, el número de marcas proteicas comunes a las 4 réplicas de cada grupo y el número de marcas proteicas comunes y exclusivas en la comparación de cada tipo hemocitario de *Ostrea edulis* sin estimulación frente a la incubación con LPS durante 60 minutos. También se incluye el número de marcas identificadas de entre las exclusivas.

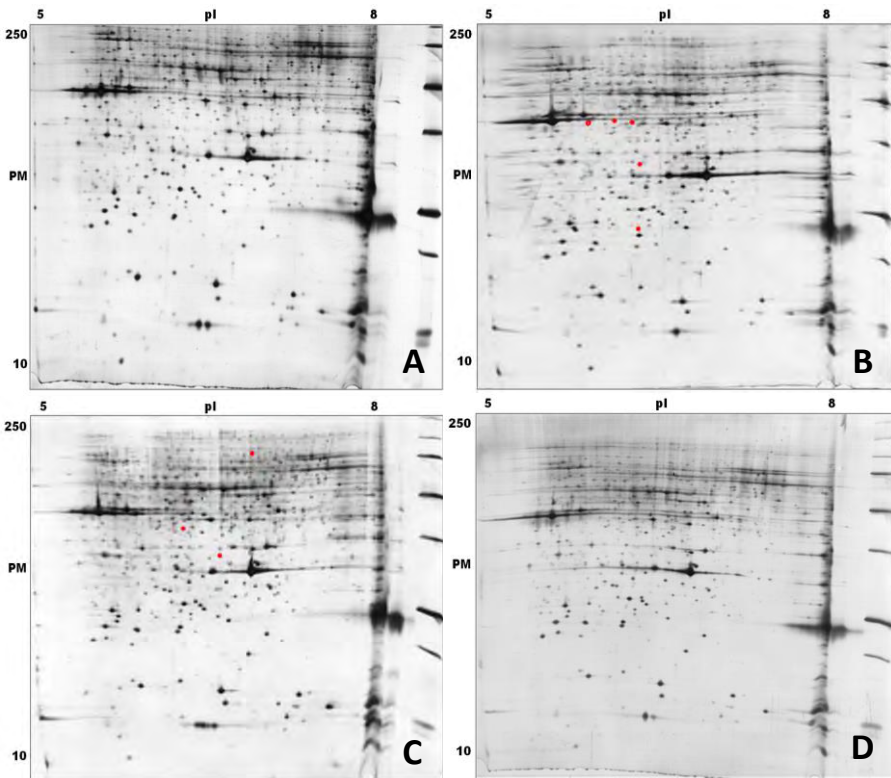
Tipos hemocitarios y tratamiento	Nº medio de marcas en los 4 geles	Nº de marcas comunes a las 4 réplicas de cada grupo	Comparación entre grupos		
			Nº de marcas comunes	Nº de marcas exclusivas	Nº de marcas identificadas
Granulocitos (G) control	891	494	409	2	1
G+LPS	1052	603		0	0
Hialinocitos (H) control	1237	730	539	0	0
H+LPS	1104	669		0	0

### 6.3.2 Estudio del efecto del enfrentamiento a Poly I:C en el proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis*

En el enfrentamiento de granulocitos con Poly I:C durante tres tiempos diferentes se obtuvieron los siguientes datos: en los geles bidimensionales de **granulocitos** sin estímulo se detectaron 632 marcas de media (Figura 11A), de las cuales 352 eran comunes a todos los geles del grupo (Figura 12A). Los geles los granulocitos incubados con **Poly I:C** durante **15 minutos** mostraron 812 marcas de media (Figura 11B), de las que 582 fueron comunes a todas las réplicas (Figura 12B). En la exposición de granulocitos a **Poly I:C** durante **30 minutos** la media de marcas proteicas detectada fue de 723 (Figura 11C), de las que 591 fueron comunes a todas las réplicas (Figura 12C). Por último, tras la incubación con **Poly I:C** durante **60 minutos** se detectaron 719 marcas de media (Figura 11D), de las cuales 458 estaban presentes en todos los geles de este grupo (Figura 12D). Al hacer una comparativa conjunta de las distintas condiciones se detectaron 269 marcas comunes a todos los tratamientos; en el caso de los granulocitos incubados con Poly I:C durante 15 minutos se observaron 5 marcas proteicas exclusivas de este grupo (Figura 11B) y para la exposición de 30 minutos se detectaron 3 marcas exclusivas de esta condición (Figura 11C).

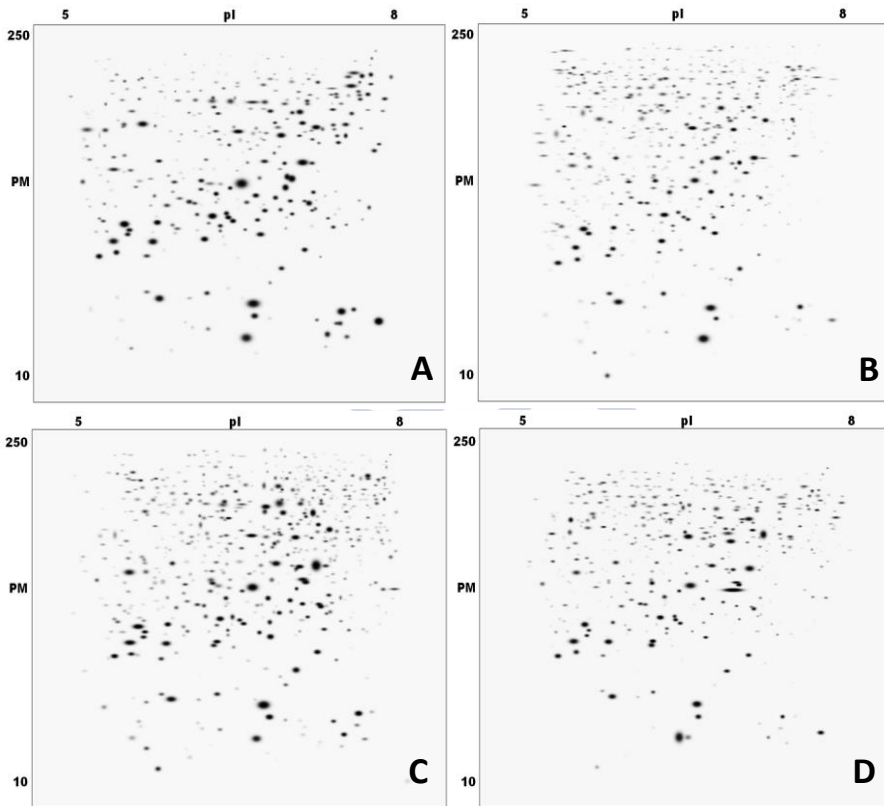


Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune



**Figura 11.** Geles representativos del patrón proteico obtenido mediante electroforesis bidimensional de los **granulocitos** de *Ostrea edulis* sin estimulación (A) y granulocitos expuestos a Poly I:C durante 15 minutos (B), 30 minutos (C) y 60 minutos (D). Los círculos rojos indican aquellas marcas exclusivas de cada grupo. pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.

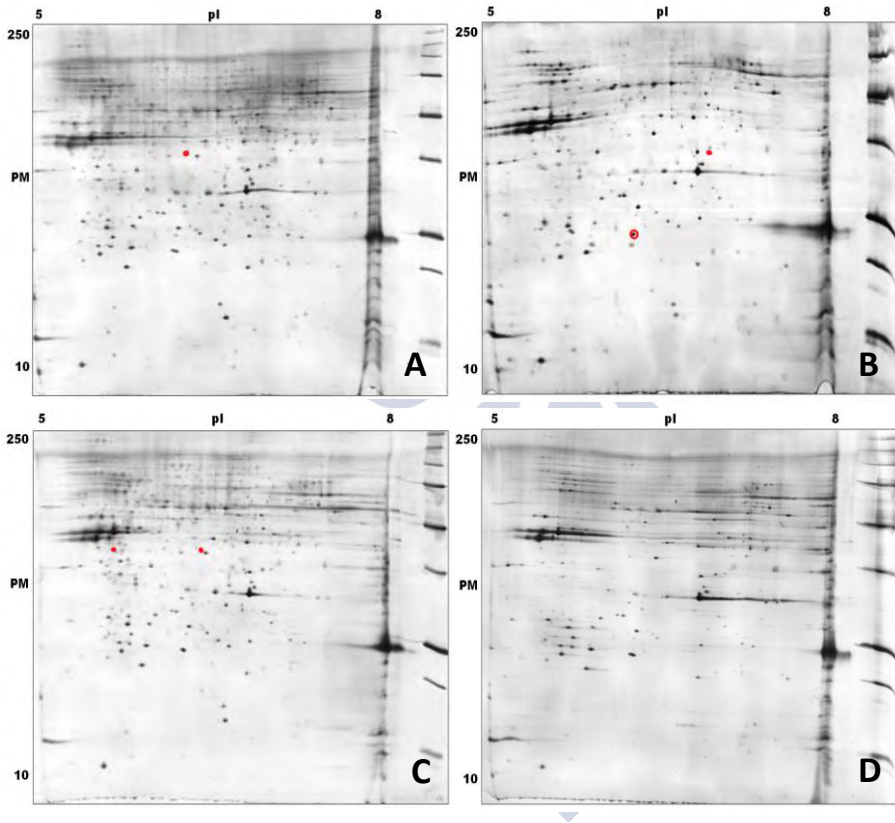




**Figura 12.** Mapas sintéticos de las marcas proteicas comunes a las cuatro réplicas de los geles que muestran la expresión proteica de los granulocitos de *Ostrea edulis* sin estimulación (A) y los granulocitos enfrentados a Poly I:C durante 15 minutos (B), 30 minutos (C) y 60 minutos (D). El peso molecular (PM) y el punto isoeléctrico (pI) se indican en los ejes vertical y horizontal respectivamente.

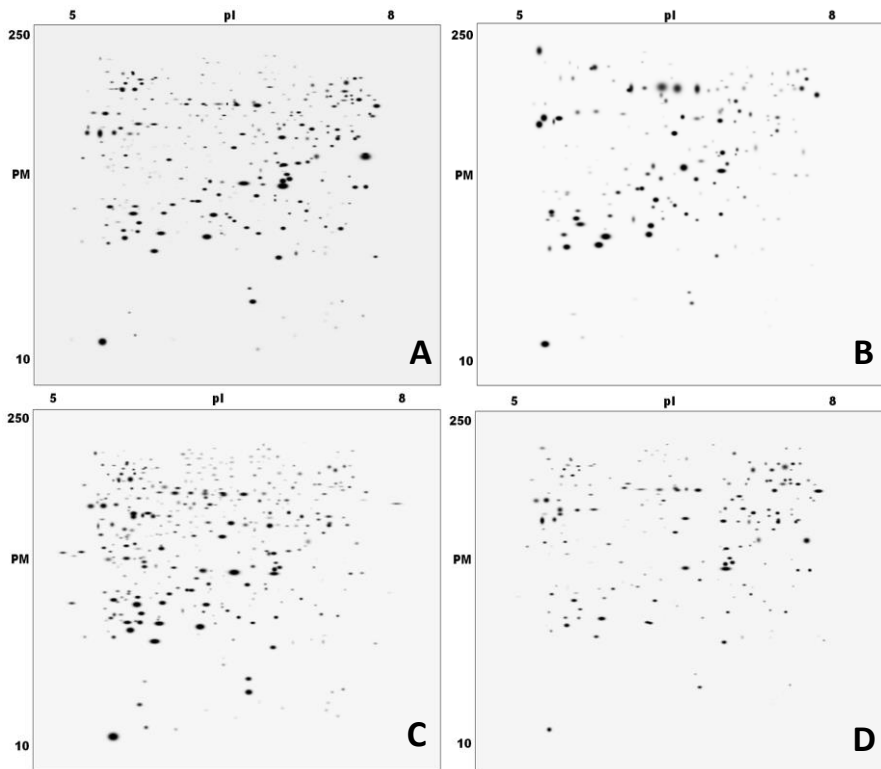
Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune

Al incubar hialinocitos con Poly I:C durante diferentes tiempos se observaron los siguientes resultados: los geles de **hialinocitos** control mostraron 491 marcas proteicas de media (Figura 13A), de las que 350 estaban presentes en todas las réplicas (Figura 14A). Al enfrentar este tipo celular al inductor **Poly I:C** durante **15 minutos** se observó una media de 313 marcas (Figura 13B), de las cuales 181 eran comunes a todo el grupo (Figura 14B). En el caso del enfrentamiento a **Poly I:C** durante **30 minutos** se detectaron 531 marcas de media (Figura 13C), de las que 398 estaban presentes en los 4 geles de este tratamiento (Figura 14C). Al incubar hialinocitos durante **60 minutos** con **Poly I:C** se observaron 330 marcas proteicas de media (Figura 13D), de las que 219 fueron comunes a todas las réplicas (Figura 14D). Comparando todos los geles se encontraron 151 marcas comunes a todos los tratamientos con hialinocitos. En los geles bidimensionales de hialinocitos sin exposición al inductor se observó 1 marca exclusiva de este grupo (Figura 13A), con la incubación con Poly I:C de 15 minutos se detectaron 2 marcas exclusivas de este tratamiento (Figura 13B) y con el enfrentamiento al inductor durante 30 minutos se encontraron 2 marcas exclusivas de esta condición (Figura 13C).



**Figura 13.** Geles bidimensionales representativos de las proteínas expresadas en los hialinocitos de *Ostrea edulis* sin estimulación (A) e hialinocitos enfrentados a Poly I:C durante 15 minutos (B), 30 minutos (C) y 60 minutos (D). Los círculos rojos indican aquellas marcas exclusivas de cada grupo. pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune



**Figura 14.** Mapas sintéticos de las marcas proteicas comunes a las cuatro réplicas de los geles que muestran la expresión proteica de los hialinocitos de *Ostrea edulis* sin estimulación (A) e hialinocitos enfrentados a Poly I:C durante 15 minutos (B), 30 minutos (C) y 60 minutos (D). El peso molecular (PM) y el punto isoeléctrico (pI) se indican en los ejes vertical y horizontal respectivamente.

El análisis de los geles bidimensionales de granulocitos e hialinocitos incubados con Poly I:C, indicando el numero de marcas proteicas comunes y exclusivas, se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3.** Resumen del análisis de geles 2-DE correspondientes a la estimulación con Poly I:C, donde se incluye el numero medio de marcas proteicas en los 4 geles de cada tipo hemocitario, el número de marcas proteicas comunes a las 4 réplicas de cada clase y el número de marcas proteicas comunes y exclusivas en la comparación de cada tipo hemocitario de *Ostrea edulis* sin estimulación frente a la incubación con Poly I:C durante distintos tiempos. También se incluye el número de marcas identificadas de entre las exclusivas.

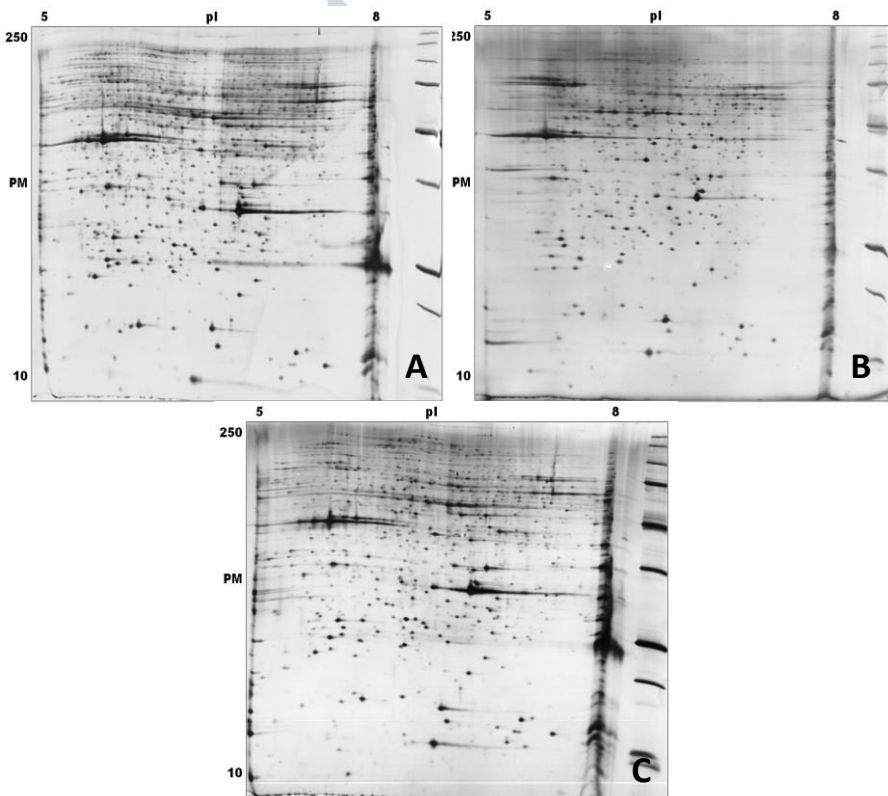
Tipos hemocitarios y tratamiento	Nº medio de marcas en los 4 geles	Nº de marcas comunes a las 4 réplicas de cada grupo	Comparación entre grupos		
			Nº de marcas comunes	Nº de marcas exclusivas	Nº de marcas identificadas
Granulocitos (G) control	632	352	269	0	0
G+Poly I:C 15 min	812	582		5	4
G+Poly I:C 30 min	723	591		3	1
G+ Poly I:C 60 min	719	458		0	0
Presentes en varios G + Poly I:C pero no en G control				0	0
Hialinocitos (H) control	491	350	151	1	1
H+Poly I:C 15 min	313	181		2	2
H+Poly I:C 30 min	531	398		2	2
H+Poly I:C 60 min	330	219		0	0
Presentes en varios H + Poly I:C pero no en H control				0	0

### 6.3.3 Estudio del efecto del enfrentamiento a Zymosan A en el proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis*

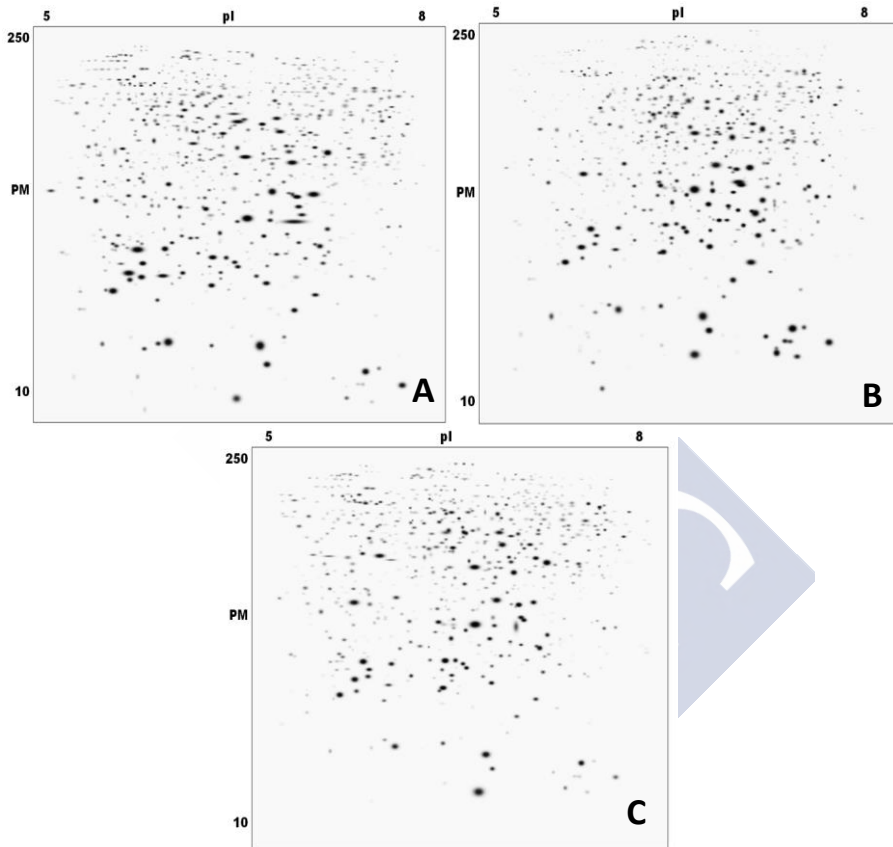
El enfrentamiento de granulocitos con Zymosan A muestra los siguientes resultados: en el caso de los geles correspondientes a **granulocitos** sin estimulación, se detectaron 1130 marcas proteicas de

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune

media de los 4 geles (Figura 15A), de las que 850 eran comunes a todas las réplicas (Figura 16A). En el caso de los granulocitos incubados con **Zymosan A** durante **30 minutos**, los geles presentaban una media de 1141 marcas (Figura 15B), de las que 790 eran comunes a todas las réplicas (Figura 16B). Cuando el tiempo de incubación fue de **60 minutos** se observaron 948 marcas proteicas de media (Figura 15C), de los que 740 estaban presentes en todos los geles del grupo (Figura 16C). Se detectaron 646 marcas comunes a todos los tratamientos con granulocitos y no se encontraron marcas exclusivas de ningún tratamiento.



**Figura 15.** Geles representativos del patrón proteico obtenido mediante electroforesis bidimensional de granulocitos de *Ostrea edulis* sin estimulación(A) y granulocitos enfrentados a Zymosan A durante 30 minutos (B) y durante 60 minutos (C). pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.

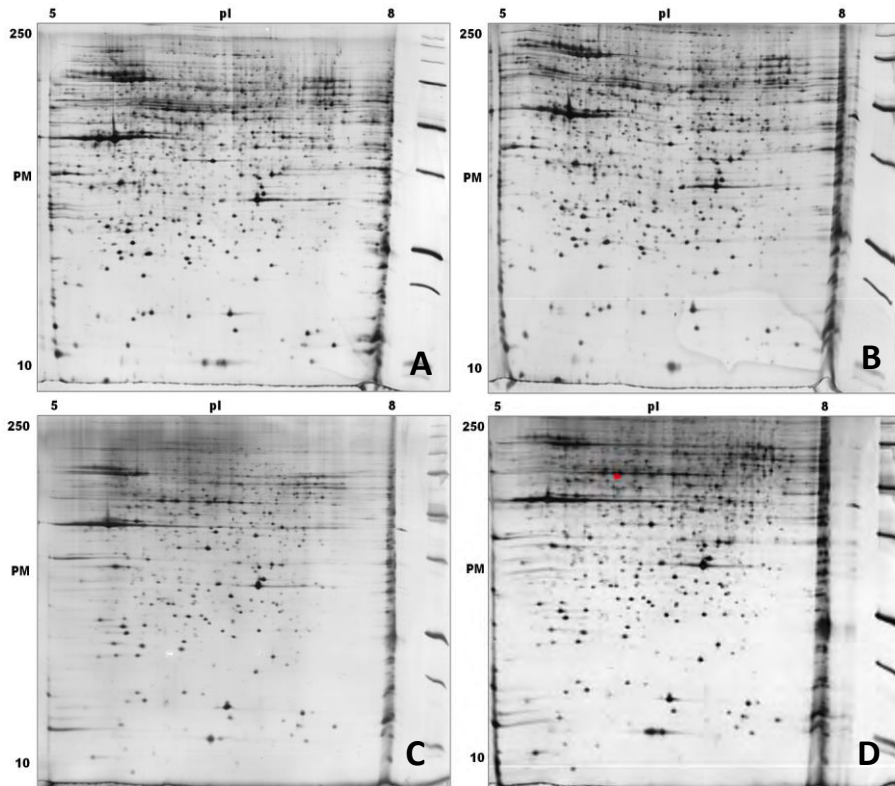


**Figura 16.** Mapas sintéticos de las marcas proteicas comunes a las cuatro réplicas de los gels de granulocitos de *Ostrea edulis* sin estimulación (A) y granulocitos enfrentados a Zymosan A durante 30 minutos (B) y 60 minutos (C). pI: punto isoelectrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.



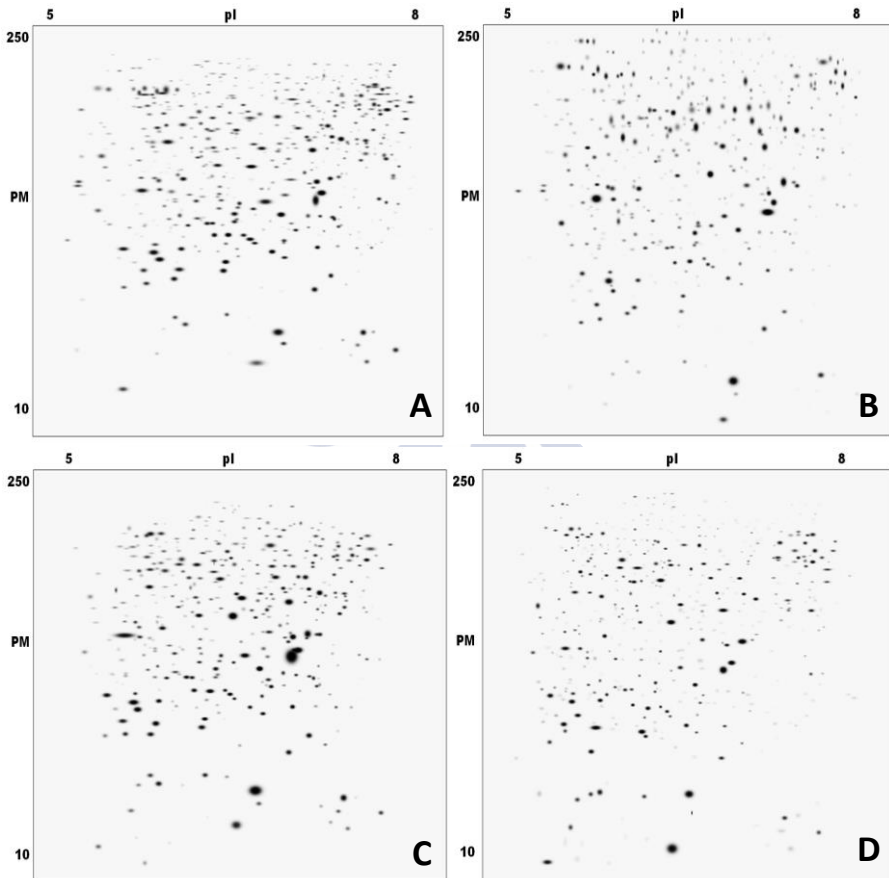
Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune

La incubación de hialinocitos con Zymosan A en diferentes condiciones deparó los siguientes resultados: los geles de **hialinocitos** sin estimulación presentaron 872 marcas proteicas de media (Figura 17A), de los que 539 fueron comunes a todas las réplicas del grupo (Figura 18A). Al enfrentar este tipo celular a **Zymosan A** durante **15 minutos** se detectó una media de 722 marcas (Figura 17B), de las cuales 457 fueron comunes a todos los geles de esta condición (Figura 18B). Cuando la incubación con **Zymosan** fue de **30 minutos** se observaron 544 marcas de media (Figura 17C), con 414 comunes a las 4 réplicas del grupo (Figura 18C). En el caso de la incubación con **Zymosan** de **60 minutos** se detectaron 801 marcas de media en todos los geles del grupo (Figura 17D), de los que 533 estaban presentes en todos ellos (Figura 18D). Al realizar una comparación conjunta de los tratamientos con hialinocitos se encontraron 317 marcas proteicas comunes a todas las condiciones. Se detectó 1 marca proteica exclusiva de los hemocitos incubados con Zymosan durante una hora (Figura 17D). Por último, se observó 1 marca presente en todos los geles de hialinocitos enfrentados a Zymosan A y ausente en hialinocitos Control (Figura 19).



**Figura 17.** Geles bidimensionales representativos de las proteínas expresadas en los hialinocitos de *Ostrea edulis* sin estimulación (A), e hialinocitos enfrentados a Zymosan A durante 15 minutos (B), 30 minutos (C) y 60 minutos (D). Los círculos rojos indican aquellas marcas exclusivas de cada grupo. pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune



**Figura 18.** Mapas sintéticos de las marcas proteicas comunes a las cuatro réplicas de los gels que muestran la expresión proteica de los hialinocitos de *Ostrea edulis* sin estimulación (A) e hialinocitos enfrentados a **Zymosan A** durante 15 minutos (B), 30 minutos (C) y 60 minutos (D). El peso molecular (PM) y el punto isoeléctrico (pI) se indican en los ejes vertical y horizontal respectivamente.

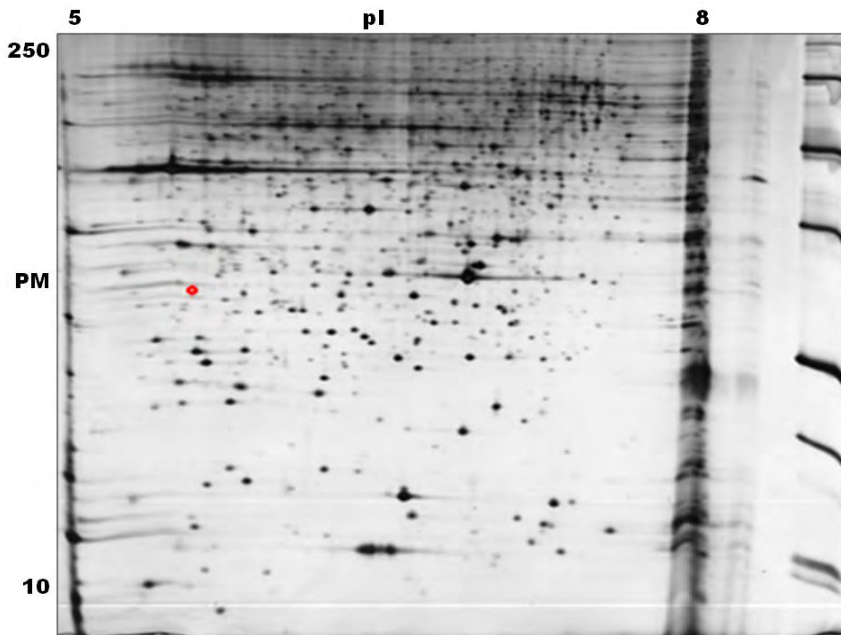


Figura 19. Gel bidimensional representativo de las proteínas expresadas en los hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos a Zymosan A. El círculo rojo indica una marca presente en todos casos de incubación con Zymosan A pero ausente en los geles de hialinocitos no estimulados. pl: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune

Los resultados del análisis de los geles del enfrentamiento a Zymosan A de granulocitos e hialinocitos se resumen en la tabla 4.

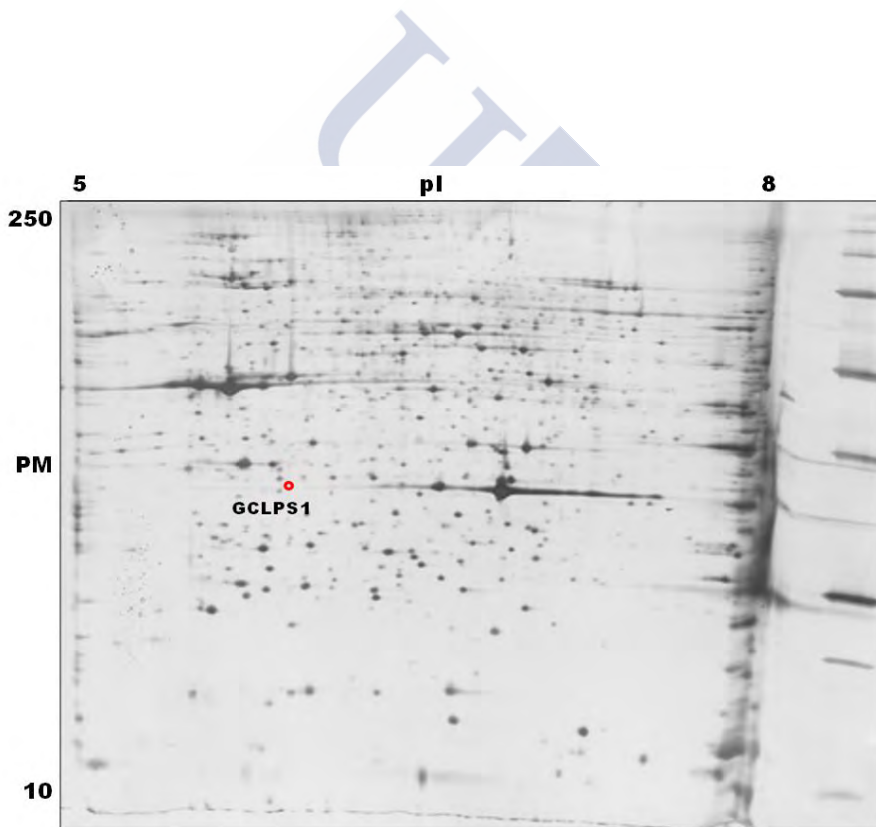
**Tabla 4.** Resumen del análisis de geles 2-DE correspondientes a la estimulación con Zymosan A, donde se incluye el número medio de marcas proteicas en los 4 geles de cada tipo hemocitario, el número de marcas proteicas comunes a las 4 réplicas de cada clase y el número de marcas proteicas comunes y exclusivas en la comparación de cada tipo hemocitario de *Ostrea edulis* sin estimulación frente a la incubación con Zymosan A durante distintos tiempos. También se incluye el número de marcas identificadas de entre las exclusivas.

Tipos hemocitarios y tratamiento	Nº medio de marcas en los 4 geles	Nº de marcas comunes a las 4 réplicas de cada grupo	Comparación entre grupos		
			Nº de marcas comunes	Nº de marcas exclusivas	Nº de marcas identificadas
Granulocitos (G) control	1130	850	646	0	0
G+Zy 30 min	1141	790		0	0
G+Zy 60 min	948	740		0	0
Presentes en los dos G+Zymosan pero no en G control				0	0
Hialinocitos (H) control	872	539	317	0	0
H+ Zy 15 min	722	457		0	0
H+ Zy 30 min	544	414		0	0
H+ Zy 60 min	801	533		1	0
Presentes en varios H+Zymosan pero no en H control				1	1

### 6.3.3 Identificación proteica

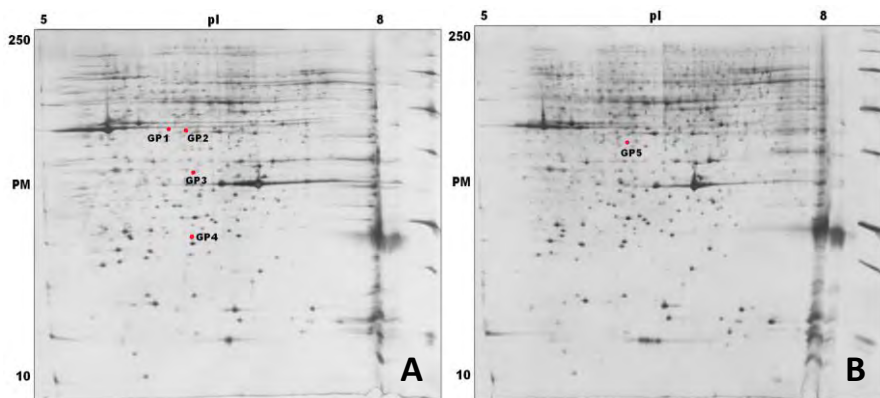
Todas las marcas proteicas consideradas exclusivas en las distintas comparaciones entre geles, mostradas en las tablas 2, 3 y 4, que presentaban una buena resolución en los geles (una distancia suficiente como para ser cortadas del gel sin interferir con otras marcas y con intensidad apropiada), se cortaron, se digirieron con tripsina y se secuenciaron mediante espectrometría de masas. Un total

de diecisiete marcas proteicas con peso molecular, pH e intensidad variables presentaron estos requisitos. Como se recoge en la tabla 5, la secuenciación permitió la identificación de proteínas específicas de granulocitos no estimulados (control) al compararlos con granulocitos enfrentados a LPS (Fig. 20), granulocitos enfrentados a Poly I:C durante 15 (Fig. 21A) y 30 minutos (Fig. 21B), hialinocitos no estimulados al compararlos con hialinocitos enfrentados a Poly I:C (Fig. 22A), hialinocitos enfrentados a Poly I:C durante 15 (Fig. 22B) y 30 minutos (Fig. 22C), e hialinocitos enfrentados a Zymosan (15, 30 y 60 minutos) al compararlos a hialinocitos no estimulados (Fig. 23).



**Figura 20.** Gel bidimensional representativo de las proteínas expresadas en los granulocitos de *Ostrea edulis* sin inductor al compararlas con granulocitos enfrentados a LPS. Las proteínas identificadas se encuentran numeradas y marcadas en rojo. pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.

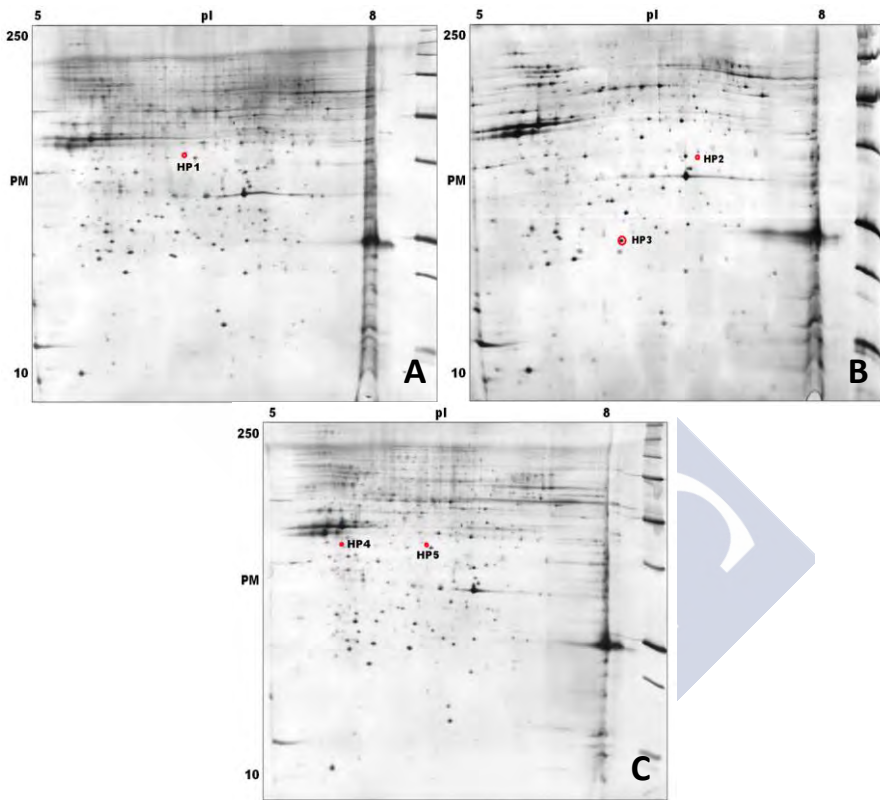
Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune



**Figura 21.** Geles bidimensionales representativos de las proteínas expresadas en los **granulocitos** de *Ostrea edulis* enfrentados a Poly I:C durante 15 minutos (A) y 30 minutos (B). Las proteínas identificadas se encuentran numeradas y marcadas en rojo pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.







**Figura 22.** Geles bidimensionales representativos de las proteínas expresadas en los hialinocitos de *Ostrea edulis* sin inductor (A) e hialinocitos enfrentados a Poly I:C durante 15 minutos (B) y 30 minutos (C). Las proteínas identificadas se encuentran numeradas y marcadas en rojo. pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune

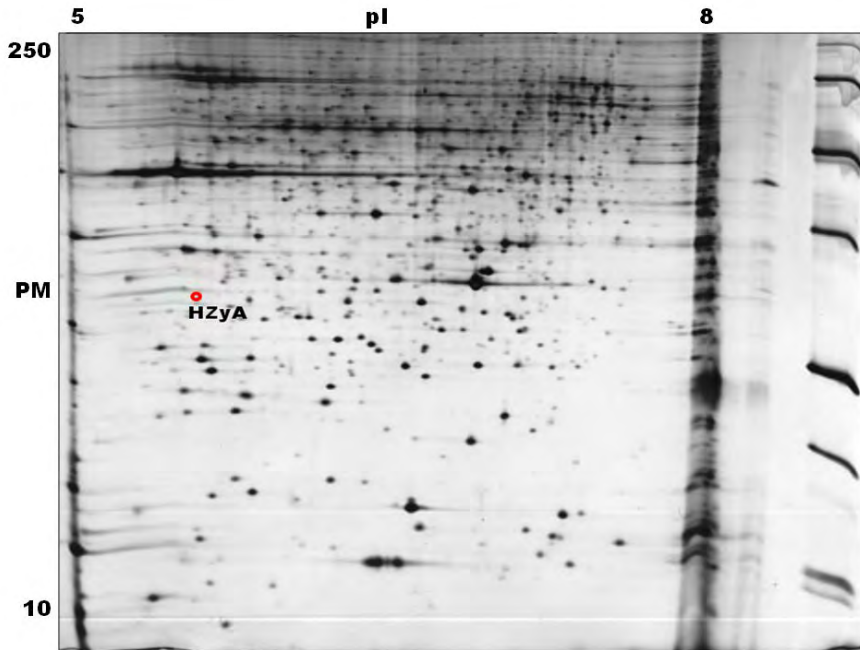


Figura 23. Gel bidimensional representativo de las proteínas expresadas en los hialinocitos de *Ostrea edulis* expuestos al Zymosan A. la proteína identificada como presente en los tres tiempos de incubación y ausente en el control aparece numerada y marcada en rojo. pI: punto isoeléctrico. PM: peso molecular en Kilodaltons.

En el caso en que se identificó una proteína hipotética, la secuencia de aminoácidos identificada coincide con la secuencia de una proteína de la ostra *C. gigas* de la que no se conoce su nombre ni función.

**Tabla 5.** Proteínas identificadas en los **granulocitos (G)** e **hialinocitos (H)** de ostras *Ostrea edulis* en los enfrentamientos “in vitro” a tres inductores de respuesta in vitro: LPS, Poly I:C y Zymosan A. El tipo celular al que corresponde cada proteína se indica con la primera letra del código. Teo: Valor teórico. Exp: valor experimental. SCORE: mejor alineamiento entre la longitud de la secuencia obtenida y la secuencia presente en la base de datos NCBI después de la búsqueda BLAST (a mayor score, mejor emparejamiento). E-VALUE: es el número de alineaciones distintas, con una puntuación igual o mejor que el Score, que se espera que ocurran debido al azar en una búsqueda de base de datos (a menor E-value, mejor emparejamiento). SECUENCIA: únicamente se muestra la secuencia con mejor emparejamiento en la base de datos.

CÓDIGO	INDUCTOR (TIEMPO DE INCUBACIÓN)	PROTEÍNA	NÚMERO DE ACCESO NCBI	PM Teo / Exp	PI Teo / Exp	FUNCIÓN BIOLÓGICA	E-VALUE	SCORE NCBI	SECUENCIA
GC LPS1	LPS (control)	Proteína 2 que contiene motivos tripartitos (TRIM2) [ <i>C. gigas</i> ]	EKC30402.1	32,89/34,80	8,17/5,93	Comunicación celular, sistema inmune	3e-18	79,5	RLWASGDNG NLVQTDLQGN QL-QKI
GP1	Poly I:C (15 min)	Actina [ <i>Ostrea edulis</i> ]	AFJ91724.1	12,47/48,02	8,6/6,11	Movilidad celular	5e-17	76,6	RKDLYANTVL SGGTTMFPGI ADRM
GP2	Poly I:C (15 min)	Aldosa 1-epimerasa [ <i>C. gigas</i> ]	EKC37522.1	39,56/47,40	6,00/6,27	Metabolismo de carbohidratos	8e-16	72,3	RTTEFGMHLY TGCNTIPHTK GKE
GP3	Poly I:C (15 min)	Hidratasa metilglutaconyl-CoA, mitocondrial, parcial [ <i>C. gigas</i> ]	EKC23051.1	24,17/35,77	7,87/6,32	Metabolismo mitocondrial, transducción	3e-19	82,9	RGSEVDIASGL SFEEAGYSQVI NTRKD
GP4	Poly I:C (15 min)	Proteína 36 que contiene dominios BTB y MATH [ <i>C. gigas</i> ]	EKC36015.1	51,23/25,77	6,32/6,28	Señalización celular, sistema inmune	1e-16	74	KSRELSFEHL WIIYYLSNDK E

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune

CÓDIGO	INDUCTOR (TIEMPO DE INCUBACIÓN)	PROTEÍNA	NUMERO DE ACCESO NCBI	PM Teo / Exp	PI Teo / Exp	FUNCIÓN BIOLÓGICA	E- VALUE	SCORE NCBI	SECUENCIA
GP5	Poly I:C (30 min)	Proteína 6 que contiene dominios de repeticiones de Anquirina [ <i>C. gigas</i> ]	EKC19420.1	121,92/ 43,80	9,23/ 6,54	Señalización celular	6e-19	81,7	KPGVSYHSTY NWNVTQGG YSLRS
HP1	Poly I:C (30 min)	Isopenicilina N epimerasa [ <i>C. gigas</i> ]	EKC29580.1	27,79/3 9,25	5,66/ 6,34	Actividad catalítica	1e-17	77,4	RLAANIYNEM ADYDKLADLL VKL
HP2	Poly I:C (control)	Posible Prolina iminopeptidasa [ <i>C. gigas</i> ]	EKC32762.1	37,54/4 1,04	5,84/ 7,03	Actividad peptidasa	4e-12	61,3	KSGKPVIFVH GGPGGGTTP RD
HP3	Poly I:C (15 min)	Glutamina sintetasa [ <i>C. gigas</i> ]	EKC18655.1	40,07/2 5,92	6,24/ 6,38	Metabolismo del nitrógeno	1e-15	71,5	RELSSSHFLAC LYAGVKIGGR N
HP4	Poly I:C (15 min)	Proteína hipotética CGI_10013674 [ <i>C. gigas</i> ]	EKC25305.1	28,53/4 3,64	10,14 /5,64	Desconocida	2e-17	77,4	KSHNTLKALV AIQPNGAFTF VSKF
HP5	Poly I:C (30 min)	Hidratasa metilglutaconyl- CoA, mitocondrial, parcial [ <i>C. gigas</i> ]	EKC23051.1	24,17/4 3,22	7,87/ 6,38	Metabolismo mitocondrial, regulación de genes	4e-12	60,9	RALKLQEIPL QGPVALRA
HZy A	Poly I:C (30 min)	Espectrina cadena β, cerebro 4 [ <i>C. gigas</i> ]	EKC36172.1	380,16/ 32.61	5,51/ 5,64	Proteína de unión	6e-21	82,1	RVTSVTAMAT EMIEAKHLESE AIKK

## 6.4 DISCUSIÓN

Los patrones de expresión proteica de hialinocitos y granulocitos cambiaron al enfrentarlos a los distintos inductores de respuesta inmune. Se constató una tendencia inversa en granulocitos con respecto a hialinocitos pues el número de marcas proteicas en los geles de los primeros aumentó con el estímulo de los inductores, mientras que en los segundos el número de marcas disminuyó. Las diferencias observadas en respuesta celular entre granulocitos e hialinocitos frente al mismo estímulo son coherentes con las observaciones de los apartados previos. No obstante, hay que resaltar la diferencia marcada en el número de marcas proteicas registradas en los geles de los controles (granulocitos e hialinocitos no estimulados) del ensayo con Poly I:C en comparación con los ensayos con LPS y Zymosan. También es reseñable que el número de marcas proteicas en los geles de granulocitos no estimulados fue mayor que en los de hialinocitos no estimulados en las pruebas con Poly I:C y con Zymosan, tal como se registró en el apartado 4.3.1, mientras que en la prueba con LPS ocurrió lo contrario.

El número de marcas proteicas detectadas como exclusivas de tratamiento fue escaso. Una razón que justifica esta escasez es el carácter muy conservador del procedimiento experimental para aceptar una marca como exclusiva, (marcas presentes en todas las réplicas del tratamiento en cuestión, claramente separadas de otras, de intensidad adecuada e inequívocamente ausentes en todas las réplicas del tratamiento con que se compara). Por otro lado, el carácter exclusivamente cualitativo de nuestro estudio no recoge diferencias de cuantitativas que muy probablemente afectarían a un número mucho mayor de proteínas que las cualitativas (presencia/ausencia). Quizás el protocolo de separación hemocitaria pudo suponer un estrés para las células que las limitase para reaccionar frente a los estímulos empleados aunque se detectaron respuestas evidentes en la variación del número de marcas proteicas en los geles.

Se detectaron discrepancias notables entre los valores teóricos del peso molecular y/o punto isoeléctrico (pI) de algunas de las proteínas identificadas y los valores observados según la posición de las marcas en los geles. Estas discrepancias podrían corresponder a isoformas generadas por una variedad de causas, incluidas las modificaciones postraduccionales, el empalme alternativo y la aparición de familias multigénicas (De La Fuente *et al.*, 2011). Un único cambio de aminoácido o una modificación postraducciona (PTM) puede alterar el punto isoeléctrico de una proteína significativamente (Fields *et al.*, 2012).

#### **6.4.1 Pruebas con el inductor de respuesta inmune LPS**

En los ensayos con el inductor LPS se identificó una proteína exclusiva en los granulocitos no estimulados, la proteína 2 que contiene motivos tripartitos (TRIM2). Las proteínas que contienen motivos tripartitos (TRIM) están involucradas en una amplia gama de procesos biológicos, incluyendo diferenciación celular, apoptosis, regulación de la transcripción y transducción de señales, teniendo un papel esencial en la regulación de la inmunidad innata (Kawai & Akira, 2011; McNab *et al.*, 2011; Ozato *et al.*, 2008). Estudios recientes han demostrado que la activación de varias vías de señalización de suma importancia en el sistema inmune como NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa- $\tau$ ) están reguladas por múltiples moléculas, incluyendo la familia de proteínas TRIM (Kawai & Akira, 2011). La familia de genes TRIM está implicada en la respuesta antiviral de moluscos (He *et al.*, 2015). El gen TRIM2 puede inhibir la transcripción viral; se sobreexpresa en ostras *C. gigas* infectadas por OsHV-1 (He *et al.*, 2015; Jouaux *et al.*, 2013; Rosani *et al.*, 2015) y tras la exposición a Poly I:C (Green *et al.*, 2015a, 2016a). Previamente se ha demostrado que las proteínas TRIM son un factor inmune importante también en ostras *C. virginica* (Guo *et al.*, 2015; Guo & Ford, 2016). En la revisión de Kawai & Akira (2011) sobre proteínas TRIM se recoge que LPS produce un aumento en la expresión de algunas de ellas, mientras que no tiene efecto sobre otras, aunque no se menciona si LPS tiene o no efecto sobre TRIM2 concretamente. Nuestros resultados sugieren que LPS provoca el bloqueo o la

inhibición de la expresión de la proteína TRIM2 en los granulocitos de *O. edulis*, lo que confirmaría un papel para esta proteína en la respuesta inmune.

#### 6.4.2 Pruebas con el inductor de respuesta inmune Poly I:C

En los ensayos con el inductor de respuesta inmune Poly I:C se identificaron 4 proteínas exclusivas de tratamiento en granulocitos, en concreto actina, aldosa 1-epimerasa, hidratasa metilglutaconil-CoA (AUH), proteína 36 que contiene dominios BTB y MATH y proteína 6 que contiene dominios de repeticiones de anquirina, y 5 en hialinocitos, isopenicilina N epimerasa (IPN epimerasa), posible prolina iminopeptidasa (PIPasa), glutamina sintetasa (GS), hidratasa metilglutaconil-CoA (AUH) y una proteína hipotética detectada previamente en *C. gigas* con función desconocida.

La actina, como componente principal del citoesqueleto, desempeña papeles importantes en muchas funciones tales como motilidad celular, fagocitosis, movimiento de orgánulos y transducción de señales (Doussau & Augustine, 2000; May & Machesky, 2001; Valentijn *et al.*, 1999). Los patógenos subvierten procesos normales de la célula huésped para crear un nicho especializado, que mejora su supervivencia. Un objetivo común y recurrente de patógenos es el citoesqueleto de la célula huésped, que es utilizado por estos microbios con propósitos que incluyen la unión, la entrada en las células, el movimiento dentro y entre las células, la formación de vacuolas y la remodelación, y la evasión de la fagocitosis (Gruenheid & Finlay, 2003). Se han documentado cambios en la expresión de actina en crustáceos en respuesta al virus del síndrome del punto blanco (WSSV) (Chai *et al.*, 2010; H.-C. Wang *et al.*, 2007) y al virus de cabeza amarilla (YHV) (Bourchoukarn *et al.*, 2008). Del mismo modo, la expresión de actina varía en diferentes moluscos en respuesta a infecciones víricas, como es el caso del virus de necrosis viral aguda en *Chlamys farreri* (G. Chen *et al.*, 2011) y del OsHV-1 en ostras *C. gigas* (Corporeau *et al.*, 2014; Jouaux *et al.*, 2013). La regulación de la expresión de la actina por los parásitos *P. olseni* y *B. ostreae* se ha observado en almejas *Ruditapes*



*philippinarum* (Fernández-Boo *et al.*, 2016) y ostras *O. edulis* (Martín-Gómez *et al.*, 2012), respectivamente. Si bien se detectó la actina sólo en los granulocitos enfrentados a Poly I:C durante 15 minutos, se trata de una proteína presente también en los granulocitos no estimulados, por tanto nuestros resultados podrían indicar la presencia de una isoforma de actina que ha sufrido modificaciones postranscripcionales como consecuencia del enfrentamiento a Poly I:C. Las proteínas relacionadas con la estructura y función del citoesqueleto son la primera diana del estrés oxidativo en bivalvos, destacando una relación directa entre la producción de ROS y variaciones en el citoesqueleto (Dalle-Donne *et al.*, 2001; Gómez-Mendikute & Cajaraville, 2003; Miura *et al.*, 2005). La carbonilación y glutatiónación de la actina puede implicar un papel protector para la actina contra el estrés oxidativo (McDonagh *et al.*, 2005). Además la fusión entre el fagosoma y el lisosoma requiere polimerización de actina (Stockinger, 2006).

La aldosa 1-epimerasa (también llamado mutarotasa) cataliza el equilibrio de  $\alpha$ -y  $\beta$ -anómeros de aldosas, jugando un papel clave en el metabolismo de los azúcares y en la vinculación de lactosa y galactosa. Este metabolismo central en el suministro de energía es esencial para el mantenimiento del organismo (Ruiz *et al.*, 1992; Whittle & Gabbott, 1986). El contenido de glucógeno está positivamente relacionado con la supervivencia de ostras (Berthelin *et al.*, 2000; Patrick *et al.*, 2006) y un bajo almacenamiento de glucógeno podría conducir a un suministro insuficiente de glucosa en bivalvos durante la respuesta inmune, aumentando así la susceptibilidad a agentes patógenos. La inmunidad de un organismo es el mayor determinante de su supervivencia, y en ella influyen estrategias de relocalización de energía (X. Wang *et al.*, 2012a, 2012b). La regulación de las actividades de transporte de glucosa se ha observado en ostras *C. gigas* en respuesta a condiciones de estrés (Hanquet *et al.*, 2011). La mortalidad de vieiras *C. farreri* infectadas por *Vibrio anguillarum* aumenta considerablemente cuando las reservas de glucógeno disponibles no son suficientes (X. Wang *et al.*, 2014). En almejas *R. philippinarum* afectadas por la enfermedad del anillo marrón se observa una disminución significativa del peso seco y

de las reservas de glucógeno (Flye-Sainte-Marie *et al.*, 2007). Moreira *et al.* (2014) también detectaron cambios en la expresión de Aldosa 1-epimerasa en los hemocitos de almejas *R. philippinarum* como respuesta a la infección bacteriana. La detección de aldosa 1-epimerasa en los granulocitos de la ostra plana enfrentados a Poly I:C durante 15 minutos sugiere que una de las primeras reacciones en los granulocitos frente a un patógeno, vírico en este caso, es un reajuste de las reservas energéticas.

La hidratasa metilglutaconil-CoA (AUH) es una proteína bifuncional que puede modular la traducción mitocondrial y participa en el metabolismo de la leucina (Nakagawa *et al.*, 1995), proporcionando un vínculo potencial entre el metabolismo mitocondrial y la regulación de genes. La mitocondria es central en el metabolismo celular y juega un papel fundamental tanto en la producción de energía como en la biosíntesis. El papel de la AUH en el catabolismo de la leucina puede estar relacionado con un efecto en la síntesis de proteínas de las mitocondrias (Richman *et al.*, 2014).. Cambios en la expresión de genes y proteínas en respuesta a Poly I:C y a la infección por OsHV-1 se han estudiado en ostras *C. gigas* (Green & Montagnani, 2013; Jouaux *et al.*, 2013; Corporeau *et al.*, 2014; Green *et al.*, 2014b, 2016a; He *et al.*, 2015; Rosani *et al.*, 2015), observando una marcada regulación diferencial de proteínas involucradas en organización del citoesqueleto, sistema inmune, inducción de señales de estrés, vías de señalización y metabolismo energético; así como un aumento en la expresión de receptores de reconocimiento viral, moléculas de señalización y efectores antivirales en los hemocitos. Nuestra detección de AUH tanto en granulocitos como en hialinocitos de ostra plana enfrentados a Poly I:C durante 15 minutos es coherente con la necesidad de síntesis proteica y regulación de la expresión génica asociada a la respuesta a dicho enfrentamiento. Es remarcable que la producción AUH como respuesta temprana antivírica sea común a ambos tipos hemocitarios de la ostra plana.

Las proteínas MATH-BTB funcionan como adaptadores que dirigen las proteínas a la ubiquitinación y posteriormente a la

proteólisis (Thomas, 2006). El sistema de ubiquitinación funciona en una amplia gama de procesos incluyendo transcripción, oncogénesis, apoptosis, ciclo celular y respuesta inmune (Passmore & Barford, 2004). BTB es un dominio de interacción proteína-proteína que participa en diversas funciones celulares de vital importancia entre las que destaca la unión de diversas proteínas a ubiquitinas para su degradación (Perez-Torrado *et al.*, 2006). Por otro lado el dominio MATH es un dominio homólogo a TRAF y Meprina, que forma parte de TRAFs (factores asociados a receptores de TNF (Factor de necrosis tumoral)), y se encuentra frecuentemente en proteínas implicadas en la transducción de señales (Perez-Torrado *et al.*, 2006). Los TRAFs pueden activar las vías de señalización JNK (quinasas C-Jun N-terminal) y NF- $\kappa$ B, dando lugar a diversas respuestas tales como inflamación, apoptosis, proliferación celular y respuestas inmunitarias contra patógenos (Dempsey *et al.*, 2003; Hehlhans & Pfeffer, 2005; L. Li *et al.*, 2009). Se han caracterizado dominios MATHs en TRAFs de varios bivalvos como *C. farreri* (Qiu *et al.*, 2009), y en ostras como *Pinctada fucata* (Huang *et al.*, 2012) y *C. gigas* (B. Huang *et al.*, 2014). Varios genes con dominios MATH forman parte de vías de señalización celular implicadas en la inmunidad innata de varios bivalvos, entre ellos las ostras *C. gigas* (Toubiana *et al.*, 2014). Thomas, (2006) sugirió que las proteínas MATH-BTB forman parte de un inmunoproteosoma relacionado con la defensa antiviral. Por otro lado los factores TRAFs con un dominio completo de MATH tienen mayor probabilidad de participar directamente en la respuesta inmune (B. Huang *et al.*, 2014). MATH se encuentra entre los dominios implicados en la inmunidad antiviral de varios moluscos marinos, como son las ostras *C. gigas* (Green *et al.*, 2015a). La detección de la proteína 36 que contiene dominios BTB y MATH en los granulocitos de la ostra plana europea enfrentados a Poly I:C durante 15 minutos es coherente con la información de los artículos previos mencionados y confirmaría el papel de esta proteína en la respuesta antivírica de los granulocitos de *O. edulis*.

Las repeticiones de anquirina (AR) están presentes en muchas proteínas biológicamente importantes, y funcionan como reguladores de interacciones específicas proteína-proteína (Ghosh *et al.*, 1998),

por lo que tienen gran relevancia en la señalización celular. Proteínas que presentan repeticiones de anquirina se han encontrado en diversos bivalvos y se consideran moléculas fundamentales en la inmunidad innata (Montagnani *et al.*, 2008; D. Zhang *et al.*, 2009b; Mu *et al.*, 2010; Q. Yang *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2013; L. Zhang *et al.*, 2014). Las repeticiones de anquirina (AR) son responsables de la interacción con proteínas NF- $\kappa$ B, y por tanto, participan en la activación de la vía de señalización NF- $\kappa$ B (Baldwin, 1996). Se han observado genes de proteínas con dominios AR cuya expresión varía entre ostras *C. gigas* resistentes y susceptibles al fenómeno de la mortalidad estival (Fleury & Huvet, 2012). Genes anquirina se han observado con una expresión diferencial en respuesta a una infección bacteriana en varios moluscos (McDowell *et al.*, 2014; K.-J. Wang *et al.*, 2008). Una proteína con repeticiones de anquirina se incluye entre los genes con importancia relevante en la respuesta de ostras *C. gigas* frente a OsHV-1 (Rosani *et al.*, 2015) Dentro de los genes que más veces se han observado expresados de manera diferencial en respuesta al estrés en bivalvos se encuentran genes de proteínas con dominios AR (Miao *et al.*, 2015). Además, el dominio de repeticiones de anquirina es uno de los genes de *O. edulis* que presentan una expresión regulada por la infección por el parásito *B. ostreae* (Martín-Gómez *et al.*, 2012). Nuestra detección de la proteína 6 que contiene repeticiones de Anquirina en granulocitos expuestos a Poly I:C durante 30 minutos confirma su implicación en la respuesta antiviral de los granulocitos de *O. edulis*. La discrepancia importante entre el valor teórico del peso molecular de la proteína 6 que contiene repeticiones de Anquirina y el valor observado en el gel podría corresponder a isoformas generadas por una variedad de causas, como modificaciones postraduccionales (Roger *et al.*, 2008), empalme alternativo o existencia de familias multigénicas (De La Fuente *et al.*, 2011).

La isopenicilina N epimerasa (IPN epimerasa) es la enzima que cataliza la conversión de isopenicilina N en penicilina N en hongos, dando lugar a la formación de cefalosporina, uno de los mejores antibióticos  $\beta$ -lactámicos, ampliamente utilizado en el tratamiento de enfermedades infecciosas (Martin *et al.*, 2004). Se ha identificado IPN epimerasa como una proteína exclusiva de los hialinocitos de *O.*

Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune

*edulis* no estimulados al compararlos con hialinocitos expuestos a Poly I:C, desgraciadamente la falta de bibliografía hace que su función no esté clara en moluscos.

La prolina iminopeptidasa (PIPasa) es una enzima que actúa específicamente escindiendo los residuos N-terminal de los residuos de prolina (Sarid, 1962). Las enzimas peptidasas son particularmente cruciales en la inmunidad innata debido a su capacidad para hidrolizar componentes proteicos de microorganismos invasores (Allam *et al.*, 2000; Paillard *et al.*, 2004). Tras la formación del fagolisosoma, además del efecto tóxico de las ROS, los microorganismos fagocitados son atacados por una variedad de enzimas lisosómicas, entre ellas las peptidasas (Gestal *et al.*, 2008). En nuestro estudio la proteína prolina iminopeptidasa (PIPasa) se detectó únicamente en hialinocitos enfrentados a Poly I:C durante 15 minutos; es posible que dicho enfrentamiento provoque una respuesta temprana antiviral en los hialinocitos, con participación de esta peptidasa para degradar proteínas víricas.

La glutamina sintetasa (GS) es una enzima ubicua que participa en funciones celulares complejas, incluyendo el metabolismo del nitrógeno, el reciclaje del neurotransmisor glutamato, la síntesis de glutamina para la producción de aminoácidos, azúcares... (Caizzi *et al.*, 1990). La glutamina sintetasa cataliza varias reacciones, siendo la conversión de glutamato en glutamina la principal (Tate *et al.*, 1972), proporcionando así nitrógeno para la producción de purinas, pirimidinas, aminoácidos y otros componentes requeridos en muchos procesos celulares esenciales. La vía glutamina sintetasa / Glutamato sintetasa (GltS) es de crucial importancia en las células ya que L-glutamina y L-glutamato son donantes de nitrógeno para la biosíntesis de los principales compuestos que contienen N, incluyendo, aminoácidos, nucleótidos y poliaminas entre otros (Reitzer, 1996). En mejillones *M. galloprovincialis* enfrentados con bacterias se observó un incremento de glutamina sintetasa (Ji *et al.*, 2013; H. Wu *et al.*, 2013a). Esta enzima también se detectó relacionada con el sistema inmune de las almejas *Mya arenaria* y *R. philippinarum* en respuesta a una infección bacteriana (Araya *et al.*,

2010; Moreira *et al.*, 2014). La expresión del enzima GS varió en la ostras *C. gigas* expuestas a distintos tipos de estrés, como hipoxia y contaminantes (Boutet *et al.*, 2004a; Sussarellu *et al.*, 2010; Tanguy *et al.*, 2005b). Existen virus capaces de producir cambios en los niveles de glutamina (Yu *et al.*, 2011), cuya formación depende de GS. Además entre los genes implicados en la respuesta inmune innata de langostinos frente al virus del síndrome de punto blanco se encuentra GS (Shi *et al.*, 2010). La detección de GS en los hialinocitos de *O. edulis* enfrentados a Poly I:C durante 15 minutos sugiere la implicación de esta enzima en la respuesta antiviral de los hialinocitos de la ostra plana.

#### **6.4.3 Pruebas con el inductor de respuesta inmune ZymosanA**

Tan sólo se identificó una proteína inducida en los ensayos realizados con el inductor Zymosan A, la cadena  $\zeta$  de espectrina, presente en todas las muestras de hialinocitos enfrentados a Zymosan, en todos los tiempos de incubación (15, 30 y 60 minutos) y ausente en los hialinocitos no estimulados.

La espectrina es una proteína de unión a actina, componente principal de un sistema de proteínas estructurales asociadas con la superficie citoplasmática de las membranas plasmáticas de la mayoría de las células de metazoos (Bennett & Gilligan, 1993), contribuyendo a la vinculación entre la membrana plasmática y el citoesqueleto (Röper *et al.*, 2002). Las subunidades  $\zeta$  contienen la mayor parte de los sitios de reconocimiento de espectrina a otras proteínas, incluyendo anquirinas y actinas (Hu *et al.*, 1995). Se han observado espectrinas presentes en moluscos, como el gasterópodo *Haliotis midae* y los bivalvos *Chlamys farreri* y *Mytilus trossulus* (Bairati & Gioria, 2008; Dyachuk & Odintsova, 2009; Huan *et al.*, 2011; Picone *et al.*, 2015). El citoesqueleto de espectrina-actina junto con las anquirinas juega papeles clave en actividades tales como motilidad celular, activación, proliferación, contacto y mantenimiento de dominios especializados de membrana (Bennett & Chen, 2001). Se ha establecido que las proteínas que comprenden dominios de espectrina juegan un papel importante en el desarrollo o iniciación de la



## Comparación del proteoma de granulocitos e hialinocitos de *Ostrea edulis* al enfrentarlos "in vitro" a inductores de respuesta inmune

respuesta inmune (Mosavi & Cammett, 2004), recientemente dichos dominios fueron descritos con una elevada importancia en la inmunidad innata de moluscos (Picone *et al.*, 2015). Nuestro hallazgo de que el enfrentamiento a Zymosan induzca la producción de esta proteína en hialinocitos de ostra plana concuerda con la importancia de las espectrinas en la inmunidad de moluscos.

Por otro lado se sabe que Zymosan induce procesos de fagocitosis por parte de los hemocitos desencadenando una serie de respuestas inmunológicas (Aladaileh *et al.*, 2007a), y que resulta ser uno de los estimulantes más potente del estallido respiratorio (Costa *et al.*, 2008; Ordás *et al.*, 2000). Las proteínas relacionadas con la estructura y función del citoesqueleto son la primera diana del estrés oxidativo en bivalvos, destacando una relación directa entre la producción de ROS y variaciones en el citoesqueleto (Dalle-Donne *et al.*, 2001; Gómez-Mendikute & Cajaraville, 2003; Miura *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que las espectrinas participan en funciones importantes del citoesqueleto (Das *et al.*, 2006), tiene sentido que el enfrentamiento a Zymosan provoque cambios en la expresión de la proteína espectrina en los hialinocitos de la ostra plana.

En nuestros resultados detectamos una diferencia importante entre el valor teórico del peso molecular de la cadena  $\uparrow$  de espectrina y el valor observado en el gel; esta diferencia podría corresponder a isoformas generadas por diferentes causas, como modificaciones postraduccionales (Roger *et al.*, 2008), empalme alternativo y existencia de familias multigénicas (De La Fuente *et al.*, 2011).

En definitiva, los granulocitos e hialinocitos de ostra plana son células que participan en la respuesta inmune y su enfrentamiento *in vitro* por separado a conocidos inductores de respuesta inmune dio lugar a variaciones de sus proteomas respectivos. Entre las proteínas cuya expresión varió se identificaron 6 en granulocitos, otras 6 en hialinocitos y una más que varió en ambos tipos hemocitarios; la mayor parte de las proteínas identificadas tienen funciones reconocidas en la respuesta inmune.





## 7 DISCUSION GENERAL

Como resultado del estudio proteómico del sistema inmune de la ostra plana *O. edulis*, a través de los diferentes planteamientos experimentales recogidos en los capítulos previos, se han identificado un gran número de proteínas con papeles relevantes en distintas funciones en el ámbito de la respuesta inmune de la ostra plana y, por tanto, vitales para la supervivencia del bivalvo. Con objeto de proporcionar una visión conjunta e integradora de las aportaciones de cada uno de los planteamientos experimentales, a continuación se reúnen todas las proteínas identificadas a lo largo del estudio, repartidas por grupos funcionales, revisando su implicación en las secciones del estudio.

### 7.1 PROTEÍNAS RELACIONADAS CON APOPTOSIS

Los mecanismos y vías de señalización que subyacen a la apoptosis son cruciales en la defensa inmune de moluscos contra parásitos protozoarios, patógenos y en procesos de toxicidad ambiental causada por diferentes contaminantes y sustancias tóxicas (Kiss, 2010; Schaumburg *et al.*, 2006; Sokolova, 2009).

Se han identificado dos proteínas implicadas en apoptosis con relevancia en la respuesta de la ostra a *Bonamia* spp. Se trata de dos proteínas detectadas exclusivamente en el grupo de hemolinfa de ostras de la estirpe EGS negativo para ambas especies de *Bonamia*: la **proteína Lupus La** y la **catepsina B**. La proteína Lupus La participa en la síntesis proteica, modulando estabilidad y/o la traducción de otras proteínas asociadas con la apoptosis (Valavanis *et al.*, 2007). Las catepsinas son proteínas implicadas en apoptosis. Tienen un papel

fundamental en la respuesta inmune de bivalvos, estando implicados en la interacción entre almejas y parásitos *Perkinsus* spp. (Kang *et al.*, 2006; Soudant *et al.*, 2013) y en los genes de defensa de vieiras *C. farreri* (Wang *et al.*, 2009b). Se ha observado que el gen de la catepsina B se sobreexpresa en la relación *O. edulis*- *Bonamia* spp. (Morga *et al.*, 2012). La manipulación de procesos apoptóticos del huésped por parásitos intracelulares ocurre tanto en vertebrados como en invertebrados (Deveraux *et al.*, 1997; Schaumburg *et al.*, 2006). Estudios previos sugieren que, *B. ostreae* podría inhibir la apoptosis para sobrevivir dentro de los hemocitos de su hospedador (Gervais *et al.*, 2016; Morga *et al.*, 2012, 2017). En nuestro estudio **catepsina B** tiene un especial interés ya que es uno de los candidatos propuestos en este estudio como marcador de resistencia o tolerancia a bonamiosis.

En la comparación entre los tipos hemocitarios dentro de granulocitos se han identificado un gran número de proteínas implicadas en apoptosis. El sistema ubiquitina proteosoma, al cual pertenece la enzima de conjugación de ubiquitina E2W (**UBE2W**), está implicado en procesos de muerte celular programada (Yamamoto *et al.*, 2006). Las proteínas que contienen motivos tripartitos (TRIM), como **TRIM38** y **TRIM2**, están involucradas en apoptosis (Kawai & Akira, 2011; McNab *et al.*, 2011; Ozato *et al.*, 2008). SOCS, que forma parte de la proteína 13 que contiene repeticiones de anquirina y SOCS box (**ASB-13**), es un importante regulador de citoquinas (Yoshimura *et al.*, 2007), las cuales están relacionados con apoptosis (Barcia & Ramos-Martinez, 2008; Ottaviani *et al.*, 2004, 1997). Las proteínas N-acetilglucosaminidasa  $\beta$ -1,6-N-acetilglucosaminil transferasa (**GlcNAcT**), **cistatina A2** y la **proteína 4 con repeticiones F-box/LRR** están involucrados en la producción de citoquinas (Brockhausen *et al.*, 1989; Ochieng & Chaudhuri, 2010; Taguchi *et al.*, 2000; J. Q. Wang *et al.*, 2014); pudiendo participar en la regulación de procesos apoptóticos. Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) como **MAPK1** y la **proteína 1 de unión a MAPK**, forman parte de una de las vías de señalización más importantes en el control de múltiples procesos fisiológicos, entre otros la muerte celular programada (Gerdol & Venier, 2015). Las

MAPKs pueden ser activadas mediante GTPasas de la familia Ras, en nuestro estudio se han identificado varias proteínas relacionadas con las vías de señalización Ras y MAPKs, estando por tanto estrechamente involucradas en procesos de apoptosis. Es el caso de la **proteína 44 activadora de Rho GTPasa** (Lacal, 1997), la **proteína 1 que contienen dominios homólogos a pleckstrina y asociados a Ras** (Chang & Karin, 2001; Lewis *et al.*, 1998; Matsunaga-Udagawa *et al.*, 2010; Sturgill & Wu, 1991; Therrien *et al.*, 1999), así como los receptores de factores de crecimiento de fibroblastos (**FGFR**) (Technau *et al.*, 2005) y el potenciador de conector supresor quinasa de Ras 2 (**CNKSR2**) (X. Wang *et al.*, 2008). Además, se han identificado otras proteínas que participan de manera importante en procesos apoptóticos: el factor elongación 1 alfa (**EF1- $\alpha$** ) (Gangwani *et al.*, 1998; Lamberti *et al.*, 2004), el factor de mortalidad 4 (**MORF4**) (Bertram *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2010), la **baculoviral IAP** (Deveraux *et al.*, 1999; Krammer, 2000; Salvesen & Duckett, 2002), la poli [ADP-ribosa] polimerasa 3 (**PARP3**) (Hartwig, 2001; Yu *et al.*, 2006), la serina proteasa mitocondrial (**HtrA2**) (Jeyaraju *et al.*, 2009; Kiss, 2010; Sokolova, 2009; Suzuki *et al.*, 2004) y la proteína 1 que interactúa con huntingtina (**HIP1**) (Hackam *et al.*, 2000; Raychaudhuri *et al.*, 2007).

Por su parte, en hialinocitos también se han identificado proteínas relacionadas con apoptosis pero en un número mucho menor. Destaca la **caspasa 2** que está implicada en gran cantidad de vías apoptóticas (Creagh *et al.*, 2003) y la **p53** (Kiss, 2010; Royds & Iacopetta, 2006; Sokolova, 2009). Otras proteínas relacionadas con procesos de muerte celular y apoptosis son: el potenciador de unión a cajas CCAAT (**C/EBP**) (Gaffen, 2011; Pope *et al.*, 2000), la **galectina** (Davicino *et al.*, 2011; Rabinovich & Gruppi, 2005; Vasta, 2009), la subunidad 4 reguladora de fosfatidilinositol 3-quinasa (**PI3K**) (Berton & Lowell, 1999), la **metalotioneína IV** (Kiningham & Kasarskis, 1998; Sato & Bremner, 1993), la  **$\beta$ -integrina** (Terahara *et al.*, 2006) y la **miticina C** (Canesi *et al.*, 2002b; Tiscar & Mosca, 2004).

## 7.2 PROTEÍNAS IMPLICADAS EN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

El sistema inmune innato está bajo control de una compleja red de vías de señalización conservadas evolutivamente, que se activan dependiendo de diferentes estímulos o invasiones. Las cascadas de señalización celular coordinan la inducción de numerosos genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria (Song *et al.*, 2010).

En granulocitos se han identificado las siguientes proteínas implicadas en vías de señalización: MAPKs como **MAPK1** y la proteína **similar a p1 de unión a MAPK**, forman parte de una de las vías de señalización más importantes en el control de variedad de procesos fisiológicos, incluyendo la inmunidad innata de bivalvos (Gerdol & Venier, 2015). La vía de señalización **NF- $\kappa$ B** que tiene un papel central en la coordinación de la expresión de una amplia variedad de genes que controlan respuestas inmunes (Li & Verma, 2002). La proteína 1 de translocación de linfoma del tejido linfoide asociado a mucosas, isoforma X1 (**MALT1**) es uno de los componentes esenciales, necesarios para el correcto funcionamiento de la vía de señalización NF- $\kappa$ B (Hayden *et al.*, 2006). La **proteína 1 que contiene dominios homólogos a pleckstrina y asociados a Ras**, está relacionada con la cascada de señalización de Ras-ERK (Chang & Karin, 2001; Lewis *et al.*, 1998; Matsunaga-Udagawa *et al.*, 2010; Sturgill & Wu, 1991); por otro lado el dominio PH (homólogo pleckstrina), estimula la vía de señalización MAPK (Therrien *et al.*, 1999). Las proteínas con dominios de repeticiones de anquirina y SOCS box (**ASB**) están implicadas en la señalización celular del sistema inmune (Kamura *et al.*, 1998). SOCS son inhibidores de las vías de señalización de citoquinas, se trata de reguladores fisiológicos clave del sistema inmune (Yoshimura *et al.*, 2007), que controlan el exceso de citoquinas e inhiben una variedad de vías de transducción de señales, en particular vías JAK-STAT (Crocker *et al.*, 2008; Yoshimura *et al.*, 2007). La enzima de conjugación de ubiquitina E2W (**UBE2W**) pertenece al sistema ubiquitina proteosoma, implicado en señalización inmune (Yamamoto *et al.*, 2006). El potenciador de conector supresor quinasa de Ras 2 (**CNKSR2**) es

capaz de regular la activación de la cascada de señalización Ras-ERK (Anselmo *et al.*, 2002; Brennan *et al.*, 2011; Clapéron & Therrien, 2007). La fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato fosfodiesterasa gamma 1 (**PLC $\gamma$ 1**) es la responsable de la producción de los segundos mensajeros DAG e IIP3, componentes esenciales en mecanismos de transducción de señales (Bloomquist *et al.*, 1988). Las **cistatinas** están implicadas en la activación de la vía del complemento (Iwanaga *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999; Vasta *et al.*, 1999). El receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1-A (**FGFR1A**) está implicado en vías de señalización Ras-MAPK (Technau *et al.*, 2005). Las enzimas serina proteasa, a las que pertenece (**HtrA2**), están implicadas en la activación de la cascada del complemento (Rawlings & Barrett, 1993) y del sistema profenoloxidasa (Aladaileh *et al.*, 2007a; Cong *et al.*, 2005; Hellio *et al.*, 2007). Las proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (**PGRPs**) desempeñan un papel central en la activación de vías de transducción de señales tipo Toll o Inmunodeficiencia (IMD) (Royet & Dziarski, 2007).

También en granulocitos se han identificado otras proteínas con funciones relevantes en transducción de señales, como son: **TRIM38** y **TRIM2** (Kawai & Akira, 2011; McNab *et al.*, 2011; Ozato *et al.*, 2008), **EF1- $\alpha$**  (Gangwani *et al.*, 1998; Lamberti *et al.*, 2004), **HSP90** (Hahn, 2009; Pratt & Toft, 2003; Yahara *et al.*, 1998), **baculoviral IAP (BIR)** (Rosani *et al.*, 2015), las moléculas de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (**CEACAMs**) (Hammarström, 1999), las **proteínas G de unión a nucleótidos de guanina** (D. Wang *et al.*, 2011), **HIF-1** (Semenza, 2007) y la **proteína activadora de Rho GTPasa 44** (Bokoch, 2005).

Las siguientes proteínas identificadas en hialinocitos también participan en diversas vías de señalización: las **proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDR)** pertenecen a la vía de señalización WNT capaz de regular muchos procesos inmunes (Staal *et al.*, 2008). La vía de señalización **PI3K** conduce a la activación de la familia Rho GTPases (Berton & Lowell, 1999). El receptor transmembrana tirosina-quinasa (**ROR**) se

consideran reguladores centrales de la señalización Wnt (Green *et al.*, 2008). Las **filaminas** tienen un papel activo en las vías de señalización a través de la activación de NF- $\kappa$ B (Feng & Walsh, 2004; Vasselon, 2002). Además también se han identificado: **flotillinas** (Hoehne *et al.*, 2005; Langhorst *et al.*, 2007), repeticiones de anquirina (**AR**) que participan en la activación de la vía de señalización NF- $\kappa$ B (Baldwin, 1996), el gen **armadillo** involucrado en la señalización TLR (McGettrick & O'Neill, 2004) e **integrinas** (Tyrrer *et al.*, 2006).

Tanto en granulocitos como en hialinocitos se han identificado diversas isoformas de inhibidores de disociación GDP Rho (**RhoGDI**); proteínas implicadas en la regulación de Rho GTPasas (Golovanov *et al.*, 2001; Olofsson, 1999), proteínas de señalización intracelular que regulan múltiples vías implicadas en organización del citoesqueleto, adhesión y apoptosis (Hall, 1994; Lacal, 1997; Mulloy *et al.*, 2010).

En granulocitos enfrentados a Poly I:C se identificó la **proteína 36 que contiene dominios BTB y MATH** y la **proteína 6 que contiene repeticiones de anquirina**. ambas proteínas implicadas en transducción de señales.

### 7.3 PROTEÍNAS RELACIONADAS CON PROCESOS REDOX

El balance redox es un proceso importante para la defensa celular. El aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), conocido como "estallido respiratorio", tiene como objetivo la degradación de microorganismos invasores (Bachère *et al.*, 1991; Comesaña *et al.*, 2012). ROS actúan como potentes efectores inmunológicos y muestran un amplio espectro de toxicidad siendo cruciales en la defensa del hospedador y en el buen funcionamiento de los hemocitos.

Nuestro estudio ha identificado varias proteínas que participan en la respuesta al estrés oxidativo de la célula. En relación con la respuesta a *Bonamia* spp., se identificaron la biliverdina reductasa A



(BVRA) y la superóxido dismutasa extracelular [Cu-Zn] (EcSOD) en el grupo de hemolinfa no infectado de las ostras de la estirpe EGS. El producto de la enzima BVRA, la bilirrubina, se ha descrito como un potente limpiador de ROS con efecto citoprotector (Kapitulnik & Maines, 2009). Se sabe que SOD está implicada en la respuesta al estrés oxidativo (Gonzalez *et al.*, 2005), siendo uno de los mecanismos más importantes de defensa antioxidante en casi todas las células, incluyendo las de moluscos (Anju *et al.*, 2013a). Varios estudios muestran la implicación de la SOD en la respuesta inmune de bivalvos, entre otros en la interacción parásito-hospedador; la expresión de EcSOD en ostras resistentes *Saccostrea glomeratata* al parásito *Martelia sydneyi* es mucho mayor que en aquellas no resistentes (Green *et al.*, 2009). La expresión de SOD varía en los hemocitos de *O. edulis* desafiados *in vitro* por *B. ostreae* (Morga *et al.*, 2011b). Además de su papel antioxidante, la SOD es responsable de producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un segundo mensajero importante que tiene potencial para causar daño oxidativo en parásitos, activar la transcripción de genes y las vías de transducción de señales e influir en la activación celular (Goodall *et al.*, 2004; Reth, 2002). Por tanto, niveles altos de actividad de Cu/Zn SOD pueden dar lugar a un estallido respiratorio más potente y letal (Goodall *et al.*, 2004). La inhibición de esta enzima por *Bonamia* spp. podría representar una estrategia eficaz para sobrevivir.

Además la **tiorredoxina 1** y la glutatión S-transferasa omega (**GST $\Omega$** ) (Lillig & Holmgren, 2007; Martins *et al.*, 2014), se detectaron en el grupo de hemolinfa positivo para *Bonamia* spp. de la estirpe EGS y en el grupo de hemolinfa con señal positiva débil para *B. ostreae* de la estirpe ERS, respectivamente. Dicha proteína también podría ser producida por el protozoo para protegerse de la defensa del bivalvo pues en *P. marinus* se observó un aumento en la expresión de la tiorredoxina después de la exposición al mucus de *C. virginica* (Pales Espinosa *et al.*, 2014). GST juega un papel importante en la defensa de bivalvos contra parásitos; en *R. philippinarum* el gen GST se expresa en almejas infectadas por *P. olseni* (Kang *et al.*, 2006) y en ostras *C. virginica* parasitadas por *P. marinus* (Tanguy *et al.*, 2004).

El aumento de la expresión de GST $\Omega$  se ha documentado previamente durante la interacción de *O. edulis* - *B. ostreae* (Martín-Gómez *et al.*, 2012; Morga *et al.*, 2011b). En nuestro estudio la glutatión S-transferasa 3 (**GST3**) se ha identificado como exclusiva de granulocitos. GST es uno de los mayores xenobióticos detoxificantes (Blanchette *et al.*, 2007) y está relacionada con la reducción de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Martins *et al.*, 2014).

Se identificaron componentes clave de la cadena respiratoria en los grupos de hemolinfa negativos para *Bonamia* spp. de ostras de las estirpes EGS y EGNS: **citocromo C oxidasa subunidad I**; **NADH deshidrogenasa**, **NADH-ubiquinona oxidorreductasa** y succinato deshidrogenasa (**SDH**). La modificación de la expresión en bivalvos de tales proteínas por diferentes parásitos se ha descrito previamente (Kang *et al.*, 2006; Perrigault *et al.*, 2009; Prado-Alvarez *et al.*, 2009a; Tanguy *et al.*, 2004), y así como en el caso concreto de la expresión génica de *O. edulis* infectada por *B. ostreae* (Martín-Gómez *et al.*, 2012). La cadena respiratoria mitocondrial es esencial en la respuesta inmune de los moluscos: i) las células inmunoestimuladas presentan mayores necesidades metabólicas y energéticas (Coyne, 2011; Van Rensburg & Coyne, 2009); ii) un sistema funcional de transporte de electrones es necesario para la fagocitosis de patógenos (Van Rensburg & Coyne, 2009) y iii) la actividad intensiva de la cadena respiratoria genera un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Koopman *et al.*, 2010), considerado un mecanismo de defensa contra patógenos invasores (De Zoysa *et al.*, 2009b). Dos de ellas, la **NADH deshidrogenasa** y la **citocromo C oxidasa subunidad I**, se detectaron como exclusivas de granulocitos. Además, ésta es uno de los candidatos propuestos en este estudio como posible marcador de resistencia o tolerancia a bonamiosis

Otras de las proteínas identificadas en granulocitos que participan en la producción de ROS y en reacciones celulares redox son: **CNKS2** (X. Wang *et al.*, 2008), la **proteína G de unión a**

**nucleótidos de guanina subunidad  $\alpha$**  (Luo *et al.*, 2014) y el factor inducible de hipoxia-1 alfa (**HIF-1 $\alpha$** ) (Choi *et al.*, 2013).

Además se han identificado proteínas que participan en dicho proceso en hialinocitos: la transcetolasa 2 (**TKT2**) tiene un papel relevante en la tolerancia al estrés oxidativo (Campos *et al.*, 2012; Dheilly *et al.*, 2013; Go & Jones, 2008), y la capacidad de eliminar ROS del citoplasma (Tomanek, 2012). La enzima **piridoxina-5'-fosfato oxidasa (PNPO)** catalizada la biosíntesis de vitamina B<sub>6</sub> (di Salvo *et al.*, 2003), un antioxidante clave en la extinción de oxígeno singlete y anión superóxido (Ehrenshaft *et al.*, 1999; Jain & Lim, 2001; Osmani *et al.*, 1999). Las metalotioneínas (**MTs**) son importantes reguladores del estrés oxidativo (Kiningham & Kasarskis, 1998; Sato & Bremner, 1993). La subunidad 4 reguladora de fosfatidilinositol 3-quinasa (**PI3K**) tiene un papel relevante en estallido respiratorio y en la producción de NO en los hemocitos (García-García *et al.*, 2008). La proteína 2 similar a **monooxigenasa que contiene flavina FMO GS-OX** juega un papel clave en detoxificación (Boutet *et al.* 2004a).

#### 7.4 PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL CITOESQUELETO

El citoesqueleto desempeña un papel central en muchas funciones celulares como regulación de la forma celular, división celular, adhesión, motilidad, migración, transducción de señales y fagocitosis (May & Machesky, 2001). Muchos parásitos son capaces de desafiar la maquinaria celular para invadir y sobrevivir dentro de las células huésped (Rottner *et al.*, 2004). Las interacciones parásito-hospedador están implicadas en cambios citoesqueléticos (Gruenheid & Finlay, 2003). Por tanto, el citoesqueleto juega un papel crucial en la respuesta inmune (Wickramarachchi *et al.*, 2010), participando en la eliminación de patógenos (G. Chen *et al.*, 2011)

En la comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras con diagnóstico diferente para *Bonamia* spp. se identificaron varias proteínas relacionadas con el citoesqueleto: el **complejo-T de la**

**proteína 1 $\alpha$** , la **proteína 3** que contiene el dominio **FH1/FH2**, la **proteína similar a Kelch 24** y la **proteína 3B** que contiene el **dominio factor A Von Willebrand** se detectaron en el grupo de hemolinfa negativo de las ostras de la estirpe EGS. Cabe destacar que dos de ellas, la proteínas **similar a Kelch 24** y la **3B que contiene el dominio factor A Von Willebrand** se proponen como posibles marcadores de resistencia o tolerancia a bonamiosis. La **cadena pesada de dineína citoplasmática** se detectó en el grupo de hemolinfa con señal positiva débil para *B. ostreae* de ostras de la estirpe. Cambios en proteínas de *O. edulis* relacionadas con el citoesqueleto asociados a la parasitación por *Bonamia* spp. se han documentado previamente, lo que es coherente con la fagocitosis del parásito por los hemocitos de la ostra (Chagot *et al.*, 1992; Martín-Gómez *et al.*, 2012; Morga *et al.*, 2011a).

Entre las proteínas exclusivas de granulocitos se identificaron diversas proteínas relacionadas con el citoesqueleto: la familia **Rho GTPasas** son proteínas de señalización intracelular que regulan múltiples vías implicadas en la organización del citoesqueleto, fagocitosis y adhesión (Hall, 1994; Lacal, 1997; Mulloy *et al.*, 2010). **HSP90** está asociado con proteínas del citoesqueleto, tales como actina y tubulina (Czar *et al.*, 1996; Garnier *et al.*, 1998; Liang & MacRae, 1997). Otras de las proteínas identificadas que están implicadas en el citoesqueleto y en fagocitosis son: la **HIP1** (Zhao *et al.*, 2016) y el **EF1- $\alpha$**  (Gangwani *et al.*, 1998; Lamberti *et al.*, 2004).

Las proteínas relacionadas con el citoesqueleto identificadas en hialinocitos fueron la **flotillina**, implicada en procesos celulares como endocitosis y fagocitosis (Bared, 2004; Bickel *et al.*, 1997; Dremina *et al.*, 2005; Hoehne *et al.*, 2005; Langhorst *et al.*, 2007; Rajendran *et al.*, 2003), la **filamina**, proteína de unión a actina implicadas en organización del citoesqueleto (Stossel *et al.*, 2001), y la **espectrina**, que es una proteína de unión a actina que contribuye a la vinculación entre la membrana plasmática y el citoesqueleto (Röper *et al.*, 2002).

Cabe destacar que se han identificado varias **actinas** con diversos puntos isoeléctricos (pIs) y pesos moleculares (PMs) tanto en granulocitos como en hialinocitos. Por tanto, en los hemocitos de *Ostrea edulis* parecen existir varios tipos de actinas o actinas con diferentes modificaciones postranscripcionales. Las secuencias genómicas de actina pueden representar varias isoformas (Adema, 2002). La expresión de diversas actinas en la respuesta inmune de varios invertebrados marinos, bivalvos entre ellos, se ha observado previamente (G. Chen *et al.*, 2011; J. Zhang *et al.*, 2010). Las modificaciones postranscripcionales de actinas pueden implicar variaciones en su función proteica (Abe *et al.*, 2000; Papakonstanti & Stournaras, 2002; Vandermoere *et al.*, 2007). Por tanto la existencia de varias isoformas de actina sugiere que estas proteínas tienen funciones complejas en los hemocitos de la ostra plana. El hecho de que esta proteína esté presente en ambos tipos celulares con ciertas modificaciones postranscripcionales diversas sugiere funciones celulares concretas que varían entre los tipos hemocitarios.

En nuestro estudio, la **actina** también se ha identificado en granulocitos expuestos a Poly I:C. Se ha demostrado que los patógenos son capaces de interferir en el citoesqueleto del huésped con objetivos como unión, entrada en las células, movimiento dentro y entre las células, formación de vacuolas y evasión de la fagocitosis (Gruenheid & Finlay, 2003). Además la fusión entre el fagosoma y el lisosoma requiere polimerización de actina (Stockinger, 2006).

Por último sólo en las muestras de hialinocitos enfrentados a Zymosan se ha identificado **espectrina** en comparación con las muestras de hialinocitos sin inductor. Dicha proteína está implicada en funciones importantes del citoesqueleto (Das *et al.*, 2006) y en la inmunidad innata de moluscos (Mosavi & Cammett, 2004; Picone *et al.*, 2015).

## 7.5 PROTEÍNAS IMPLICADAS EN TRANSCRIPCIÓN, TRADUCCIÓN Y DEGRADACIÓN PROTEICA

Se han identificado proteínas implicadas en la síntesis proteica (transcripción y traducción) y en su degradación. Con la comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras con diagnóstico diferente para *Bonamia* spp., se detectó **ARN helicasa p47**, implicada en traducción, exclusivamente en el grupo de hemolinfa negativo de ostras de la estirpe EGS. La **proteína dedos de zinc ZFAT**, implicada en la transcripción se detectó en el grupo de hemolinfa positivo de ostras de esa misma estirpe. Continuando con la estirpe EGS, el **factor de iniciación eucariótica 4A-III** y la **proteína P2 ribosomal ácida 60S**, ambas implicadas en síntesis de proteínas, se detectaron en el grupo de hemolinfa negativo y en el positivo, respectivamente. Tiene sentido que los factores de transcripción y traducción se modifiquen como consecuencia de la bonamiosis. En general, la presencia de un parásito conduce a cambios en el genoma y el proteoma del hospedador como mecanismo de respuesta a la infección (Cao *et al.*, 2009; Cronin *et al.*, 2001; Martín-Gómez *et al.*, 2012; Morga *et al.*, 2010). En particular, la interacción parásito-hospedador inhibe la expresión de eIF4A, y por lo tanto bloquea la traducción de proteínas (Prasad *et al.*, 2014). Hay que destacar que el **factor de iniciación eucariótica 4A-III** se propone en este estudio como posible marcador de resistencia o tolerancia a la bonamiosis. En granulocitos se identificaron el factor elongación 1 alfa (**EF1- $\alpha$  o eEF1A**), clave en la traducción de proteínas (Browne & Proud, 2002; Ejiri, 2002) y la proteína **bifuncional BirA**, que actúa como regulador transcripcional (Brennan *et al.*, 1989).

La degradación de las proteínas es otro proceso relevante en la homeostasis de las proteínas. La **subunidad reguladora 8 de la proteasa 26S** y la **proteína 2 asociada a la ubiquitina**, implicadas en la degradación proteica, se detectaron en el grupo de hemolinfa negativo de ostras de la estirpe EGS y en el grupo de hemolinfa con señal débil para *B. ostreae* de la estirpe ERS, respectivamente. Se han observado variaciones en la expresión del gen de la subunidad



reguladora de la proteasa 26S en las ostras planas parasitadas por *B. ostreae* (Martín-Gómez *et al.*, 2012). El proteasoma juega un papel crítico en la degradación de la proteína mediada por ubiquitina a través de la vía ubiquitina-proteasoma y está implicado en la proliferación celular, apoptosis y respuestas al estrés, por tanto el proteasoma es considerado como un componente esencial del sistema de defensa (H. Wu *et al.*, 2013a). La **subunidad reguladora 8 de la proteasa 26S** es otro de los candidatos propuestos en este estudio como marcador de resistencia o tolerancia a bonamiosis. También implicada en la degradación proteica, la enzima de conjugación de ubiquitina E2W (**UBE2W**) se identificó como exclusiva de granulocitos.

Además proteínas implicadas en transcripción y en síntesis proteica se han identificado en hialinocitos y granulocitos enfrentados a Poly I:C. La hidratasa metilglutaconil-CoA (**AUH**) se detectó en ambos tipos celulares aunque de forma más temprana en granulocitos. En hialinocitos se detectó también la glutamina sintetasa (**GS**); la vía Glutamina sintetasa es de crucial importancia en las células y participa en la biosíntesis de aminoácidos entre otras moléculas (Reitzer, 1996). GS participa en la respuesta inmune innata de invertebrados frente a virus como WSSV (virus del síndrome de punto blanco) (Shi *et al.*, 2010). Se ha observado que existen virus capaces de producir cambios en los niveles de glutamina en vertebrados (Yu *et al.*, 2011).

## 7.6 PROTEÍNAS IMPLICADAS EN METABOLISMO ENERGÉTICO

Se sabe que las reservas energéticas del huésped se movilizan para generar la energía necesaria para contrarrestar al parásito (Engelsma *et al.*, 2014). Además, las células inmunitarias requieren un suministro constante de energía para el mantenimiento básico y funciones inmunitarias específicas, tales como migración, fagocitosis y citotoxicidad (Buttgereit *et al.*, 2000; Krauss *et al.*, 2001). La estimulación inmunitaria da como resultado un aumento de la actividad bioquímica y, por tanto, una mayor demanda de ATP. Por lo tanto, procesos cruciales para las funciones inmunes específicas se



deterioran rápidamente cuando las células inmunitarias son privadas de energía (Coyne, 2011).

Mediante la comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras con distinto diagnóstico para *Bonamia* spp. se detectaron dos proteínas involucradas en el metabolismo energético, adenilosuccinato sintetasa (**AdSS**) y arginina quinasa (**AK**), en el grupo de hemolinfa negativo de ostras de la estirpe EGS. La AdSS cataliza la primera reacción en la síntesis de AMP, su regulación se considera un punto de control en el mantenimiento de la relación ATP/GTP celular (Raman *et al.*, 2004). Esta enzima es otro de los candidatos propuestos en este estudio como posibles marcadores de resistencia o tolerancia a bonamiosis. La AK, cataliza la transferencia de un grupo fosfato entre fosfoarginina y ADP para producir L-Arginina y ATP durante el proceso de respuesta inmune. L-Arginina es la única fuente fisiológica del átomo de nitrógeno para producir óxido nítrico (Kinsey & Lee, 2003), lo que se considera crucial en la respuesta inmune innata (Apel & Hirt, 2004). Así, AK podría desempeñar un papel importante en la respuesta inmune contra patógenos invasores modulando la concentración de NO (Shi *et al.*, 2012). En el caso del grupo de hemolinfa negativo de ostras de la estirpe EGNS se identificó la **adenilato quinasa**, que desempeña un papel importante en la provisión de ATP para funciones citoesqueléticas cruciales en los mecanismos de defensa y es reconocida como un marcador sensible del estado energético celular (van HoSRSen *et al.* 2009; Dzeja & Terzic 2009).

En la respuesta de los granulocitos a Poly I:C, se identificó la **aldosa 1-epimerasa**, implicada en el metabolismo de los azúcares. Bajo la invasión de patógenos el organismo desvía los recursos energéticos disponibles de los procesos menos críticos a donde es más necesario (Zhou *et al.*, 2010), por tanto en la inmunidad de un organismo influyen estrategias de relocalización de energía (X. Wang *et al.*, 2012a, 2012b).

## 7.7 PROTEÍNAS IMPLICADAS EN RECONOCIMIENTO

El reconocimiento inmune juega un papel de vital importancia en el sistema inmunológico al discriminar lo propio de sustancias no propias; paso esencial en la activación de una respuesta inmune coordinada y eficaz, sobre todo en organismos que carecen de inmunidad adaptativa.

En granulocitos se identificaron las siguientes proteínas con funciones de reconocimiento: las proteínas con **dominios LRR**, que reconocen y se unen a patrones moleculares asociados a patógenos específicos (PAMPs) (He *et al.*, 2015), y la proteína de reconocimiento de peptidoglicano SC2 (**PGRP SC2**) y la molécula 1 de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario (**CEACAM1**), que son PRRs (Chen *et al.*, 2015; Royet & Dziarski, 2007) capaces de unirse a patógenos proporcionando una respuesta inmune innata para controlar la infección (Schmitter *et al.*, 2004).

Las proteínas identificadas en hialinocitos implicadas en reconocimiento fueron: las **galectinas**, capaces de unirse a los glicanos presentes en la superficie de microorganismos y favorecer la entrada de patógenos dentro de las células huésped (Tasumi & Vasta, 2007); las **histonas**, capaces de unirse a LPS y otros PAMPs para eliminar diversos patógenos (Nikapitiya & Dorrington, 2013); las **integrinas**, que pertenecen a una familia de receptores transmembrana que son responsables de procesos de adhesión y desplazamiento celular, degranulación, fagocitosis y encapsulación en invertebrados (Tyrrer *et al.*, 2006); la **miticina C**, que participa en el reconocimiento de patógenos y posee propiedades antibacterianas y antifúngicas (Canesi *et al.*, 2002b; Tiscar & Mosca, 2004); la proteína 4 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (**LDR4**), pues los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) son receptores de superficie celular implicados en la captura de una gran diversidad de lipoproteínas de baja densidad (Gotthardt *et al.*, 2000), y el dominio 10 similar al factor de crecimiento epidérmico múltiple (**MEGF10**), que participa en las interacciones receptor-ligando

(Campbell & Bork, 1993); MEGF10 se considera un receptor relacionado con el sistema inmune de ostras (Chen *et al.*, 2015).

## 7.8 PROTEÍNAS IMPLICADAS EN OTRAS FUNCIONES INMUNES

Se identificaron proteínas implicadas en funciones también asociadas a la respuesta inmune pero diferentes a las correspondientes a los grupos funcionales tratados previamente.

Con la comparación del proteoma de la hemolinfa entre ostras con diagnóstico diferente para *Bonamia* spp. se identificó a la proteína fumitremorgin A (**fmtA**) en el grupo de hemolinfa positivo para *B. ostreae* de ostras de la estirpe EGNA. Esta proteína desempeña un papel importante en la resistencia de bacterias y virus (D. Wang *et al.*, 2011). La **proteína 2 del complemento C1q** se identificó en el grupo de hemolinfa negativo de ostras de esta misma estirpe. C1q es el primer subcomponente del complejo C1 de la vía clásica de activación del complemento, que es crucial para la eliminación de patógenos en invertebrados (Zhang *et al.*, 2008).

Como proteínas exclusivas de granulocitos se identificaron: la **cistatina A2**, implicada en coagulación y activación del complemento (Iwanaga *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999; Vasta *et al.*, 1999), la **quelato férrico reductasa**, que favorece la producción de factores antimicrobianos (Y. Sun *et al.*, 2014), la serina proteasa mitocondrial (**HtrA2**), implicada en la activación de la cascada del complemento (Rawlings & Barrett, 1993) y la activación del sistema profenoloxidasa (Aladaileh *et al.*, 2007a; Cong *et al.*, 2005; Hellio *et al.*, 2007), la  **$\alpha$ -Manosidasa lisosomal**, encargada de la digestión y la eliminación de partículas extrañas (Cheng, 1992; Gestal *et al.*, 2008), y la **proteína 2 relacionada con lipasa pancreática**, enzima implicada en el metabolismo lipídico que participa en digestión; citotoxicidad y presenta propiedades antimicrobianas (Lowe, 2000).

En granulocitos enfrentados a Poly I:C se identificó la peptidasa **prolina iminopeptidasa**, proteína que participa en la eliminación de microorganismos fagocitados (Gestal *et al.*, 2008; Sokolova, 2009).

En hialinocitos se identificaron: **C/EBPs**, factores de transcripción que regulan la expresión de diversas citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-17 (Gaffen, 2011; Pope *et al.*, 2000), La **miticina C**, péptido antimicrobiano con propiedades antibacterianas y antifúngicas (Canesi *et al.*, 2002b; Tiscar & Mosca, 2004), y la **histona H2A** que puede actuar como péptido antimicrobiano (C. Li *et al.*, 2007).

## 7.9 COMPARACIÓN DEL PROTEOMA ENTRE GRANULOCITOS E HIALINOCITOS DE *O. EDULIS*

El estudio comparativo entre los tipos hemocitarios realizado mediante 2-DE y "shotgun" ha resultado en la identificación de gran cantidad de proteínas exclusivas de cada tipo celular con funciones clave en el sistema inmune. Las diferencias en el metabolismo celular sugieren, que granulocitos e hialinocitos pueden estar implicados en diferentes funciones fisiológicas (Hong *et al.*, 2014).

Nuestros resultados muestran 19 proteínas exclusivas de granulocitos implicadas en procesos apoptóticos, y 8 en hialinocitos, lo que sugiere que, como se ha demostrado en estudios previos (Goedken *et al.*, 2005; Sunila & LaBanca, 2003) la apoptosis tiene más relevancia en los granulocitos. El hecho de que se detectasen proteínas implicadas en muerte celular programada diferentes hace pensar que granulocitos e hialinocitos podrían tener mecanismos diversos en la eliminación de partículas extrañas como patógenos; observación que se ha manifestado con anterioridad (Wikfors & Alix, 2014).

Se han identificado 22 proteínas de granulocitos implicadas en vías de señalización, y 8 en hialinocitos. Los granulocitos son considerados los principales hemocitos inmunocompetentes en la ostra *C. gigas*, ya que poseen mayor capacidad fagocítica, mayor expresión

de genes relacionados con el sistema inmune y mayor producción de moléculas activas (Wang *et al.*, 2017). De las 22 proteínas identificadas en granulocitos implicadas en transducción de señales principalmente participan en importantes vías de señalización de la respuesta inmune como MAPK, Ras y NF- $\kappa$ B. El mayor número de proteínas implicadas en estas vías detectado en granulocitos podría estar relacionado con la mayor capacidad inmune de este tipo celular. Por su parte varias proteínas de hialinocitos están implicadas en la vía de señalización WNT, dicha cascada se ha documentado ampliamente por sus funciones reguladoras durante la cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos (Fathke *et al.*, 2006; Z. Zhang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2016). Estudios previos indican una especialización de los hialinocitos en agregación y reparación de heridas (Ruddell, 1971; Suzuki *et al.*, 1991), nuestros resultados parecen concordar con este hecho al identificar la vía de señalización WNT más relacionada con hialinocitos que con granulocitos.

Dentro de las proteínas implicadas en procesos redox se identificó un número similar de proteínas en ambos tipos celulares (6 en granulocitos y 5 en hialinocitos). Estos datos sugieren que pueden existir variaciones en el estallido respiratorio entre los tipos hemocitarios. Estudios previos demuestran que granulocitos e hialinocitos son capaces de reaccionar de manera distinta frente a varios tipos de estrés, incluso de diferenciar entre especies de patógenos (H. Li *et al.*, 2008). Además se cree que los mecanismos para eliminar partículas extrañas podrían ser diferentes entre dichos tipos celulares (Wikfors & Alix, 2014); por ejemplo la vía NO-sintasa parece ser más dominante en hialinocitos, mientras que la NADPH-oxidasa es más activa en granulocitos (Lambert *et al.*, 2007). Por otra lado, parece que este proceso no es igual entre granulocitos e hialinocitos; aunque normalmente se considera que la actividad oxidativa a través de la producción de ROS es más elevada en granulocitos que en hialinocitos (Donaghy *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2013; Lambert *et al.*, 2007, 2003; Wang *et al.*, 2017), existen estudios donde se ha observado mayor producción de ROS en hialinocitos (Evariste *et al.*, 2016); en cualquier caso, se ha apuntado que ambos

hemocitos con capaces de producir ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) distintos (Hong *et al.*, 2013).

En granulocitos se identificaron 4 proteínas con funciones relacionadas con el citoesqueleto y 3 en hialinocitos. Estudios previos han encontrado diferencias en funciones relacionadas con el citoesqueleto entre los tipos hemocitarios de ostra como son la locomoción (Kuchel *et al.*, 2010), actividad fagocítica (Cajaraville & Pal, 1995; Fisher, 1988; López *et al.*, 1997c; Chu, 2000; Kuchel *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2013) y encapsulación (Aladaileh *et al.*, 2007b). Los granulocitos se consideran el tipo celular con mayor actividad fagocítica (Cajaraville & Pal, 1995; Fisher, 1988; López *et al.*, 1997c; Chu, 2000; Kuchel *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2013). Todos los procesos de fagocitosis se llevan a cabo mediante la reorganización del citoesqueleto de actina (May & Machesky, 2001), por tanto diferencias en las actinas presentes entre granulocitos e hialinocitos sugieren procesos fagocíticos diversos entre los tipos hemocitarios, este hecho concuerda con estudios anteriores (C López *et al.*, 1997a; Terahara *et al.*, 2006). La proteína  **$\beta$ -integrina** tiene un interés especial puesto que en *C. gigas* se ha demostrado que la fagocitosis de hialinocitos está regulada por un mecanismo dependiente de integrina (Terahara *et al.*, 2006); nuestros resultados concuerdan con este hecho ya que se ha identificado esta proteína únicamente en hialinocitos. Además, la subunidad 4 reguladora de fosfatidilinositol 3-quinasa (**PI3K**) también se ha identificado exclusivamente en hialinocitos; PI3K es una de las principales vías de señalización mediada por integrinas en fagocitosis (Berton & Lowell 1999).

Se han identificado diversas proteínas entre los tipos hemocitarios especializadas en reconocimiento, con una mayor representación en hialinocitos que en granulocitos. Estudios previos demuestran que granulocitos e hialinocitos son capaces de reaccionar de manera distinta frente a varios tipos de estrés, incluso de diferenciar entre especies de patógenos (H. Li *et al.*, 2008); tiene sentido pensar que en esta diferenciación estén implicadas diversas moléculas de reconocimiento. Por otro lado hay autores que creen que las



diferencias en la capacidad fagocítica entre tipos hemocitarios pueden estar relacionadas con la naturaleza de las partículas fagocitadas y con una fagocitosis basada en receptores de iniciación (Evariste *et al.*, 2016; Hine, 1999; C López *et al.*, 1997a; Terahara *et al.*, 2006), donde el reconocimiento de dichas partículas es esencial.

Las dos únicas proteínas relacionadas con la activación de la cascada del complemento que se identificaron en la comparación proteómica entre los dos tipos hemocitarios se detectaron en granulocitos.

Ambos tipos hemocitarios tienen propiedades inmunológicas y antimicrobianas pero parece que los granulocitos están más especializados. Es comúnmente asumida la hipótesis de que los granulocitos son el principal tipo hemocitario implicado en la defensa inmune de bivalvos (Carballal *et al.*, 1997c; Donaghy & Volety, 2011; Hégaret *et al.*, 2003; Terahara *et al.*, 2006). Se ha observado una mayor cantidad de enzimas lisosomales presentes en granulocitos que en hialinocitos (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a; López *et al.*, 1997a; Pipe *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2017). *B. ostreae* se multiplica con mayor éxito en el interior de hialinocitos que de granulocitos, sugiriendo que el sistema defensivo de granulocitos es más eficaz en la destrucción del parásito (Cochennec-Laureau *et al.*, 2003a). Todos estos estudios concuerdan con nuestros resultados donde se han identificado más proteínas implicadas en digestión y con propiedades antimicrobianas en granulocitos que en hialinocitos apoyando la idea de que los granulocitos son los principales hemocitos inmunocompetentes (Wang *et al.*, 2017).



## 8 CONCLUSIONES

- I. La presencia de *Bonamia* spp. provoca cambios en el proteoma de la hemolinfa de *Ostrea edulis*. Las proteínas con expresión modificada por el parásito son posibles factores clave en la interacción huésped-parásito y pueden jugar un papel relevante en la resistencia o tolerancia a la bonamiosis.
- II. La bonamiosis provoca cambios en la expresión de algunas proteínas implicadas en las principales vías metabólicas. Tales cambios pueden i) ser causados por el parásito, para bloquear el metabolismo del hospedador con el fin de escapar de los mecanismos de defensa, o ii) reflejan una disfunción metabólica en el hospedador como consecuencia de la enfermedad.
- III. La producción de algunas proteínas del hemocito de la ostra implicadas en el metabolismo energético y en apoptosis se ve bloqueada por el parásito, lo que le beneficia pues permite su supervivencia y multiplicación en los hemocitos de la ostra.
- IV. Una de las estrategias de *Bonamia* spp. para sobrevivir en el interior del bivalvo podría ser interferir con el estallido respiratorio de *O. edulis* mediante bloqueo de la cadena respiratoria, en particular de la superóxido dismutasa Cu/Zn.

- V. Las proteínas citocromo C oxidasa subunidad I, adenilosuccinato sintetasa, factor de iniciación eucariótico 4A-III, subunidad reguladora 8 proteasa 26S, proteína similar a Kelch 24, catepsina B y proteína 3B que contiene el dominio factor A von Willebrand son candidatas a ser consideradas marcadores de resistencia o tolerancia frente a bonamiosis, lo que ha de confirmarse con estudios *ad hoc*.
- VI. Tanto los granulocitos como los hialinocitos de *O. edulis* incluyen en su proteoma múltiples proteínas con función inmune por lo que ambos tipos celulares están implicados en el sistema de defensa. No obstante, hay diferencias en el proteoma entre granulocitos e hialinocitos de la ostra plana, incluidas proteínas con función inmune, lo que sugiere disparidad funcional entre los dos tipos hemocitarios.
- VII. Se identificaron más proteínas implicadas en fagocitosis y apoptosis en granulocitos que en hialinocitos, lo que sugiere que ambas funciones celulares tienen más relevancia en los primeros.
- VIII. Se identificaron más proteínas implicadas en determinadas vías de señalización importantes en la respuesta inmune como MAPK, Ras y NF- $\kappa$ B en granulocitos, mientras que en hialinocitos hay más proteínas identificadas que participan en la vía de señalización WNT. Esto sugiere un predominio diferente de vías de transducción entre los tipos hemocitarios y refuerza la disparidad funcional.
- IX. La modificación del proteoma en respuesta a varios inductores del sistema inmunes es diferente entre granulocitos e hialinocitos de *O. edulis*.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., 2000. General properties of immune responses, in: Cellular and Molecular Immunology. Interamericana McGraw Hill.
- Abbe, G.R., McCollough, C.B., Barker, L.S., Dungan, C.F., 2010. Performance of Disease-Tolerant Strains of Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) in the Patuxent River, Maryland, 2003 to 2007. *J. Shellfish Res.* 29, 161–175.
- Abbott, A., 1999. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature*.
- Abe, A., Sacki, K., Yasunaga, T., Wakabayashi, T., 2000. Acetylation at the N-terminus of actin strengthens weak interaction between actin and myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 14–19.
- Abebe, A.T., Devoid, S.J., Sugumaran, M., Etter, R., Robinson, W.E., 2007. Identification and quantification of histidine-rich glycoprotein (HRG) in the blood plasma of six marine bivalves. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 147, 74–81.
- Abollo, E., Ramilo, A., Casas, S.M., Comesaña, P., Cao, A., Carballal, M.J., Villalba, A., 2008. First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. *Aquaculture* 274, 201–207.
- Abollo, E., Villalba, A., 2012. Enfermedades causadas por parásitos del grupo Haplosporidia, in: *Enfermedades de Moluscos Bivalvos de Interés En Acuicultura*. pp. 283–314.
- Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M., Nathanson, C.M., 2003. Cystatins. *Biochem.Soc.Symp.*
- Adamo, S., 2008. Norepinephrine and octopamine: linking stress and immune function across phyla. *Invertebr. Surviv. J.* 5, 12–19.
- Adams, J., Kelso, R., Cooley, L., 2000. The kelch repeat superfamily of proteins: Propellers of cell function. *Trends Cell Biol.* 10, 17–24.
- Adema, C.M., 2002. Comparative study of cytoplasmic actin DNA sequences from six species of Planorbidae (Gastropoda: Basommatophora). *J. Molluscan Stud.* 1, 3–5.
- Adema, C.M., Vanderknaap, W.P.W., Sminia, T., 1991. Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity - the role of reactive oxygen intermediates. *Rev. Aquat. Sci.* 4, 201–223.
- Aderem, A., Ulevitch, R.J., 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782–787.
- Adhya, M., Choi, K.S., Yu, Y., Cho, M., 2010. Expression and localization of MCSialec, a sialic acid-specific lectin in the marine bivalve Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *J. Fish Dis.* 33, 889–899.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L.,

- Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W., 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–93.
- Aebersold, R., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198–207.
- Aggarwal, B.B., 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 745–56.
- Airoldi, L., Beck, M.W., 2007. Loss, status and trends for coastal marine habitats of Europe 345–405.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801.
- Aladaileh, S., Nair, S. V., Raftos, D.A., 2007a. Induction of phenoloxidase and other immunological activities in Sydney rock oysters challenged with microbial pathogen-associate molecular patterns. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 1196–208.
- Aladaileh, S., Nair, S. V., Birch, D., Raftos, D. a, 2007b. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. *J. Invertebr. Pathol.* 96, 48–63.
- Aladaileh, S., Nair, S. V., Raftos, D.A., 2008. Effects of noradrenaline on immunological activity in Sydney rock oysters. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 627–636.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th Edition, New York. Garland Science.
- Alderman, D.J., 1986. Fungal diseases of marine invertebrates. *Pathol. Mar. Aquac. European A.*
- Allam, B., Ashton-Alcox, K.A., Ford, S.E., 2001. Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 365–375.
- Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., 2000. Alterations in hemolymph and extrapallial fluid parameters in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with the pathogen *Vibrio tapetis*. *J. Invertebr. Pathol.* 76, 63–69.
- Alonso, S., Pethe, K., Russell, D.G., Purdy, G.E., 2007. Lysosomal killing of Mycobacterium mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6031–6036.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*
- Alvarez-Chaver, P., Rodríguez-Piñero, A.M., Rodríguez-Berrocal, F.J., García-Lorenzo, A., Páez de la Cadena, M., Martínez-Zorzano, V.S., 2011. Selection of putative colorectal cancer markers by applying PCA on the soluble proteome of tumors: NDK A as a promising candidate. *J. Proteomics* 74, 874–86.
- Alyakrinskaya, I.O., 2001. The dimensions, characteristics and functions of the crystalline style of molluscs. *Biol. Bull.* 28, 523–535.
- Amelina, H., Apraiz, I., Sun, W., Cristobal, S., 2007. Proteomics-Based Method for the Assessment of Marine Pollution Using Liquid Chromatography Coupled with Two-Dimensional Electrophoresis research articles. *J. Proteome Res.* 6, 2094–2104.
- Anderson, N.L., Anderson, N.G., 1998. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19, 1853–1861.
- Anderson, R.S., 1994. Hemocyte-derived reactive oxygen intermediate production in four bivalve mollusks. *Dev. Comp. Immunol.* 18, 89–96.
- Anderson, R.S., 1981. Inducible hemolytic activity in *Mercenaria mercenaria* hemolymph. *Dev. Comp. Immunol.* 5, 575–85.

- Anderson, R.S., Patel, K.M., Roesijadi, G., 1999. Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: Implications for hemocyte defense responses. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 443–449.
- Anderson, R.S., Beaven, A.E., 2001. Antibacterial activities of oyster (*Crassostrea virginica*) and mussel (*Mytilus edulis* and *Geukensia demissa*) plasma. *Aquat. Living Resour.* 14, 343–349.
- Anestis, A., Pörtner, H.O., Lazou, A., Michaelidis, B., 2008. Metabolic and molecular stress responses of sublittoral bearded horse mussel *Modiolus barbatus* to warming sea water: implications for vertical zonation. *J. Exp. Biol.* 211, 2889–2898.
- Anisimova, A.A., Ponomareva, A.L., Grinchenko, A. V., Kirsanova, I.A., Kravchenko, D.N., 2017. The composition and seasonal dynamics of the hemocyte cell population in the clams *Corbicula japonica* Prime (1864) of the Kievka River (the basin of the Sea of Japan). *Russ. J. Mar. Biol.* 43, 156–163.
- Anju, A., Jeswin, J., Thomas, P.C., Paulton, M.P., Vijayan, K.K., 2013a. Molecular cloning, characterization and expression analysis of cytoplasmic Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 946–50.
- Anju, A., Jeswin, J., Thomas, P.C., Vijayan, K.K., 2013b. Molecular cloning, characterization and expression analysis of F-type lectin from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 170–4.
- Anselmo, A.N., Bumeister, R., Thomas, J.M., White, M.A., 2002. Critical Contribution of Linker Proteins to Raf Kinase Activation. *J. Biol. Chem.* 277, 5940–5943.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–99.
- Apraiz, I., Mi, J., Cristobal, S., 2006. Identification of proteomic signatures of exposure to marine pollutants in mussels (*Mytilus edulis*). *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1274–1285.
- Araya, M.T., Markham, F., Mateo, D.R., McKenna, P., Johnson, G.R., Berthe, F.C.J., Siah, A., 2010. Identification and expression of immune-related genes in hemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*, challenged with *Vibrio splendidus*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 557–564.
- Arivalagan, J., Yarra, T., Marie, B., Sleight, V.A., Duvernois-Berthet, E., Clark, M.S., Marie, A., Berland, S., 2017. Insights from the shell proteome: Biomineralization to adaptation. *Mol. Biol. Evol.* 34, 66–77.
- Armstrong, P.B., 2006. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology.*
- Arnér, E.S.J., Holmgren, A., 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.*
- Arockiaraj, J., Vanaraja, P., Easwvaran, S., Singh, A., Alinejaid, T., Othman, R.Y., Bhassu, S., 2011. Gene profiling and characterization of arginine kinase-1 (MrAK-1) from freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Fish Shellfish Immunol.* 31, 81–9.
- Arockiaraj, J., Vanaraja, P., Easwvaran, S., Singh, A., Othman, R.Y., Bhassu, S., 2012. Molecular functions of chaperonin gene, containing tailless complex polypeptide 1 from *Macrobrachium rosenbergii*. *Gene* 508, 241–9.
- Arzul, I., Renault, T., Lipart, C., 2001. Experimental herpes-like viral infections in marine bivalves: demonstration of interspecies transmission. *Dis. Aquat. Organ.* 46, 1–6.
- Arzul, I., Gagnaire, B., Bond, C., Chollet, B., Morga, B., Ferrand, S., Robert, M., Renault, T., 2009. Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *Ostrea edulis*. *Dis. Aquat. Organ.* 85, 67–75.
- Arzul, I., Omnes, E., Robert, M., Chollet, B., Joly, J.P., Miossec, L., Franand, C., Garcia, C.,

2010. Distribution of *Bonamia exitiosa* in flat oyster *Ostrea edulis* populations in France. *Aquac.* 2010.
- Arzul, I., Langlade, A., Chollet, B., Robert, M., Ferrand, S., Omnes, E., Lerond, S., Couraleau, Y., Joly, J.-P., François, C., Garcia, C., 2011. Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*? *Vet. Parasitol.* 179, 69–76.
- Arzul, I., Carnegie, R.B., 2015. New perspective on the haplosporidian parasites of molluscs. *J. Invertebr. Pathol.* 131, 32–42.
- Asokan, R., Arumugam, M., Mullainadhan, P., 1997. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Dev. & Comp. Immunol.* 21, 1–12.
- Auffret, M., 1988. Bivalve hemocyte morphology. *Am. Fish. Spec. Publ.* 169–177.
- Auffret, M., 1989. Comparative study of the hemocytes of two oyster species: the European flat oyster, *Ostrea edulis*, Linnaeus, 1750 and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *J. Shellfish Res.* 367–373.
- Azéma, P., Travers, M.A., De Lorgeril, J., Tourbiez, D., Dégremont, L., 2015. Can selection for resistance to OsHV-1 infection modify susceptibility to *Vibrio aestuarianus* infection in *Crassostrea gigas*? First insights from experimental challenges using primary and successive exposures. *Vet. Res.* 46.
- Azéma, P., Lamy, J.B., Boudry, P., Renault, T., Travers, M.A., Dégremont, L., 2017. Genetic parameters of resistance to *Vibrio aestuarianus*, and OsHV-1 infections in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, at three different life stages. *Genet. Sel. Evol.* 49, 1–16.
- Azevedo, C., Montes, J., Corral, L., 1999. A revised description of Haplosporidium armoricanum, parasite of *Ostrea edulis* L. from Galicia, northwestern Spain, with special reference to the spore-wall filaments. *Parasitol. Res.* 85, 977–83.
- Azevedo, C., Hine, P.M., 2017. Haplosporidia, in: *Handbook of the Protists*. Springer International Publishing, Cham, pp. 823–850.
- Azuma, K., Kawahara, A., Hattori, S., Taira, T., Tsurutani, J., Watari, K., Shibata, T., Murakami, Y., Takamori, S., Ono, M., Izumi, H., Kage, M., Yanagawa, T., Nakagawa, K., Hoshino, T., Kuwano, M., 2012. NDRG1/Cap43/Drg-1 may predict tumor angiogenesis and poor outcome in patients with lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 7, 779–89.
- Bachali, S., Jager, M., Hassanin, A., Schoentgen, F., Jollès, P., Fiala-Medioni, A., Deutsch, J.S., 2002. Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function. *J. Mol. Evol.* 54, 652–664.
- Bachère, E., Chagot, D., Grizel, H., 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.* 12, 549–559.
- Bachère, E., Hervio, D., Mialhe, E., 1991. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* 11, 173–180.
- Badariotti, F., Lelong, C., Dubos, M.P., Favrel, P., 2007. Characterization of chitinase-like proteins (Cg-Clp1 and Cg-Clp2) involved in immune defence of the mollusc *Crassostrea gigas*. *FEBS J.* 274, 3646–3654.
- Baggerman, G., Vierstraete, E., De Loof, A., Schoofs, L., 2005. Gel-Based Versus Gel-Free Proteomics: A Review. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*
- Bahat, A., Perlberg, S., Melamed-Book, N., Lauria, I., Langer, T., Orly, J., 2014. StAR Enhances Transcription of Genes Encoding the Mitochondrial Proteases Involved in Its Own Degradation. *Mol. Endocrinol.* 28, 208–224.
- Bahr, L.M., Lanier, W.P., 1981. The Ecology of Intertidal Oyster Reefs of the South Atlantic Coast: A Community Profile. *Fish Wildl. Serv.*



- Bairati, A., Gioria, M., 2008. An ultrastructural study of cell junctions and the cytoskeleton in epithelial cells of the molluscan integument. *J. Morphol.* 269, 319–331.
- Baldwin, A., 1996. The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: New discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 649–681.
- Balouet, G., Poder, M., Cahour, A., 1983. Haemocytic parasitosis: Morphology and pathology of lesions in the French flat oyster, *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* 34, 1–14.
- Balseiro, P., Falcó, A., Romero, A., Dios, S., Martínez-López, A., Figueras, A., Estepa, A., Novoa, B., 2011. *Mytilus galloprovincialis* myticin C: a chemotactic molecule with antiviral activity and immunoregulatory properties. *PLoS One* 6, e23140.
- Bannister, C., Key, D., 1982. *Bonamia* a new threat to the native oyster fishery. *Fishes Notes*. MAFF, Lowestoft.
- Bao, Y., Li, L., Zhang, G., 2008. The manganese superoxide dismutase gene in bay scallop *Argopecten irradians*: cloning, 3D modelling and mRNA expression. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 425–432.
- Bao, Y., Wang, Q., Liu, H., Lin, Z., 2011. A small HSP gene of bloody clam (*Tegillarca granosa*) involved in the immune response against *Vibrio parahaemolyticus* and lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 729–733.
- Barber, B.J., Ford, S.E., Haskin, H.H., 1988. Effects of the parasite MSX (*Haplosporidium nelsoni*) on oyster (*Crassostrea virginica*) energy metabolism. 2. Tissue biochemical composition. *Comp. Biochem. Physiol. A* 91A, 603–608.
- Barber, B.J., Davis, C. V., 1994. Prevalence of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* populations in Maine, in: *Journal of Shellfish Research*. p. 298.
- Barcia, R., Cao, A., Arbeteta, J., Ramos-Martinez, J.I., 1999. The IL-2 receptor in hemocytes of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *IUBMB Life* 48, 419–423.
- Barcia, R., Ramos-Martinez, J., 2008. Effects of interleukin-2 on nitric oxide production in molluscan innate immunity. *Invertebr. Surviv. J.* 43–49.
- Bared, S.M., 2004. Association of ABCA1 with Syntaxin 13 and Flotillin-1 and Enhanced Phagocytosis in Tangier Cells. *Mol. Biol. Cell* 15, 5399–5407.
- Barracco, M.A., Medeiros, I.D., Moreira, F.M., 1999. Some haemato-immunological parameters in the mussel *Perna perna*. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 387–404.
- Barth, T., Moraes, N., Barracco, M.A., 2005. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* of different habitats of Santa Catarina Island, Brazil. *Aquat. Living Resour.*
- Bass, M.B., Fromm, H.J., Rudolph, F.B., 1984. The mechanism of the adenylosuccinate synthetase reaction as studied by positional isotope exchange. *J. Biol. Chem.* 259, 12330–3.
- Bassim, S., Genard, B., Gauthier-Clerc, S., Moraga, D., Tremblay, R., 2014. Ontogeny of bivalve immunity: assessing the potential of next-generation sequencing techniques. *Rev. Aquac.* 7, 197–217.
- Batista, F.M., López-Sanmartín, M., Grade, A., Navas, J.I., Ruano, F., 2016. Detection of *Bonamia exitiosa* in the European flat oyster *Ostrea edulis* in southern Portugal. *J. Fish Dis.* 39, 607–611.
- Baud, J.P., Gérard, A., Naciri-Graven, Y., 1997. Comparative growth and mortality of *Bonamia ostreae*-resistant and wild fiat oysters, *Ostrea edulis*, in an intensive system. I. First year of experiment. *Mar. Biol.* 130, 71–79.
- Bayne, C.J., Moore, M.N., Carefoot, T.H., Thompson, R.J., 1979. Hemolymph functions in *Mytilus californianus*: The cytochemistry of hemocytes and their responses to foreign implants and hemolymph factors in phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.*
- Bayne, C.J., Sminia, T., Van der Knaap, W.P.W., Manning, M.J., 1980. Immunological



- memory: status of molluscan studies., Phylogeny. ed, Phylogeny of immunological memory. Elsevier North-Holland Biomedical Press.
- Bayne, C.J., 1990. Phagocytosis and Non-Self Recognition in Invertebrates. *Bioscience* 40, 723–731.
- Bayne, C.J., Hahn, U.K., Bender, R.C., 2001. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasitology* 123 Suppl, S159–67.
- Beattie, J.H., Davis, J.P., Downing, S.L., Chew, K.K., 1988. Summer mortality of Pacific oysters. *Am Fish Soc Spec Publ* 18, 265–268.
- Bebiano, M.J., G eret, F., Hoarau, P., Serafim, M.A., Coelho, M.R., Gnassia-Barelli, M., Rom eo, M., 2004. Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species. *Biomarkers* 9, 305–330.
- Beck, M.W., Brumbaugh, R.D., Airoidi, L., Carranza, A., Coen, L.D., Crawford, C., Defeo, O., Edgar, G.J., Hancock, B., Kay, M.C., Lenihan, H.S., Luckenbach, M.W., Toropova, C.L., Zhang, G., Guo, X., 2011. Oyster Reefs at Risk and Recommendations for Conservation, Restoration, and Management. *Bioscience* 61, 107–116.
- Beninger, P.G., Le Pennec, G., Le Pennec, M., 2003. Demonstration of nutrient pathway from the digestive system to oocytes in the gonad intestinal loop of the scallop *Pecten maximus* L. *Biol. Bull.* 205, 83–92.
- Bennett, V., Gilligan, D.M., 1993. The Spectrin-Based Membrane Skeleton and Micron-Scale Organization of the Plasma Membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 27–66.
- Bennett, V., Chen, L., 2001. Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 61–67.
- Berkelman, T., Stenstedt, T., 2002. 2-D Electrophoresis: principles and methods.
- Berthelin, C., Kellner, K., Mathieu, M., 2000. Storage metabolism in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 125, 359–369.
- Berton, G., Lowell, C.A., 1999. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cell. Signal.* 11, 621–35.
- Bertram, M., NG, B., X, H.-S., Q, R., JK, L., S, B., K, S., RJ, B., A, B., Y, N., LJ, C., EK, P., JC, B., JR, S., OM, P.-S., 1999. Identification of a Gene That Reverses the Immortal Phenotype of a Subset of Cells and Is a Member of a Novel Family of Transcription Factor-Like Genes *J* 19, 1479–1485.
- Bettencourt, R., Dando, P., Collins, P., Costa, V., Allam, B., Serr yo Santos, R., 2009. Innate immunity in the deep sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 152, 278–89.
- Bettencourt, R., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, P., Afonso, M., Shank, T., Santos, R.S., 2010. High-throughput sequencing and analysis of the gill tissue transcriptome from the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *BMC Genomics* 11, 559.
- Betti, M., Ciacci, C., Lorusso, L.C., Canonico, B., Falcioni, T., Gallo, G., Canesi, L., 2006. Effects of tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) on *Mytilus* haemocytes: role of stress-activated mitogen-activated protein kinases (MAPKs). *Biol. Cell* 98, 233–244.
- Beutler, B., 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40, 845–859.
- Bezemer, B., Butt, D., Nell, J., Adlard, R., Raftos, D., 2006. Breeding for QX disease resistance negatively selects one form of the defensive enzyme, phenoloxidase, in Sydney rock oysters. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 627–636.
- Bickel, P.E., Scherer, P.E., Schnitzer, J.E., Oh, P., Lisanti, M.P., Lodish, H.F., 1997. Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 13793–13802.
- Bielka, H., 1982. *The Eukaryotic Ribosome*. Springer, Berlin.

- Bigot, A., Doyen, P., Vasseur, P., Rodius, F., 2009. Metallothionein coding sequence identification and seasonal mRNA expression of detoxification genes in the bivalve *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 382–387.
- Bigot, L., Zatylny-Gaudin, C., Rodet, F., Bernay, B., Boudry, P., Favrel, P., 2012. Characterization of GnRH-related peptides from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Peptides* 34, 303–10.
- Birge, R.B., Ucker, D.S., 2008. Innate apoptotic immunity: the calming touch of death. *Cell Death Differ.* 15, 1096–1102.
- Birkbeck, T., McHenry, J., Nottage, A., 1987. Inhibition of filtration in bivalves by marine vibrios. *Aquaculture* 67, 247–248.
- Biron, D.G., Joly, C., Galeotti, N., Ponton, F., Marché, L., 2005. The proteomics: a new prospect for studying parasitic manipulation. *Behav. Processes* 68, 249–53.
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Görg, A., Westermeier, R., Postel, W., 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* 6, 317–339.
- Blanchette, B., Feng, X., Singh, B.R., 2007. Marine glutathione S-transferases. *Mar. Biotechnol.* 9, 513–542.
- Blandin, S., Levashina, E.A., 2004. Thioester-containing proteins and insect immunity. *Mol. Immunol.*
- Blitvich, B.J., Rayms-Keller, A., Blair, C.D., Beaty, B.J., 2001. Complete cDNA and deduced amino acid sequence of the chaperonin containing T-complex polypeptide 1 (CCT) delta subunit from *Aedes triseriatus* mosquitoes. *DNA Seq.* 12, 203–8.
- Bloomquist, B.T., Shortridge, R.D., Schneuwly, S., Perdew, M., Montell, C., Steller, H., Rubin, G., Pak, W.L., 1988. Isolation of a putative phospholipase c gene of drosophila, *norpA*, and its role in phototransduction. *Cell* 54, 723–733.
- Bogdan, C., Röllinghoff, M., Diefenbach, A., 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol. Rev.* 173, 17–26.
- Bogdan, C., 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* 2, 907–16.
- Bohlon, S.S., Fraser, D.A., Tenner, A.J., 2007. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol. Immunol.*
- Bokoch, G.M., 2005. Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *Trends Cell Biol.*
- Bonzon-Kulichenko, E., Pérez-Hernández, D., Núñez, E., Martínez-Acedo, P., Navarro, P., Trevisan-Herraz, M., Ramos, M.D.C., Sierra, S., Martínez-Martínez, S., Ruiz-Meana, M., Miró-Casas, E., García-Dorado, D., Redondo, J.M., Burgos, J.S., Vázquez, J., 2011. A robust method for quantitative high-throughput analysis of proteomes by 18O labeling. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M110.003335.
- Borst, D.W., Laufer, H., Landau, M., Chang, E.S., Hertz, W.A., Baker, F.C., Schooley, D.A., 1987. Methyl farnesoate and its role in crustacean reproduction and development. *Insect Biochem.* 17, 1123–1127.
- Boshra, H., Li, J., Sunyer, J.O., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish, in: *Fish and Shellfish Immunology*. pp. 239–262.
- Bou Aoun, R., Hetru, C., Troxler, L., Doucet, D., Ferrandon, D., Matt, N., 2011. Analysis of thioester-containing proteins during the innate immune response of *Drosophila melanogaster*. *J. Innate Immun.* 3, 52–64.
- Bouchut, A., Roger, E., Coustau, C., Gourbal, B., Mitta, G., 2006a. Compatibility in the *Biomphalaria glabrata/Echinostoma caproni* model: Potential involvement of adhesion genes. *Int. J. Parasitol.* 36, 175–184.
- Bouchut, A., Sautiere, P.E., Coustau, C., Mitta, G., 2006b. Compatibility in the *Biomphalaria*

- glabrata/Echinostoma caproni* model: Potential involvement of proteins from hemocytes revealed by a proteomic approach. *Acta Trop.* 98, 234–46.
- Boulo, V., Mialhe, E., Rogier, H., Paolucci, F., Grizel, H., 1989. Immunodiagnosis of *Bonamia ostreae* (Ascomycota) infection of *Ostrea edulis* L. and subcellular identification of epitopes by monoclonal antibodies. *J. Fish Dis.* 12, 257–262.
- Bourchookarn, A., Havanapan, P.O., Thongboonkerd, V., Krittanai, C., 2008. Proteomic analysis of altered proteins in lymphoid organ of yellow head virus infected *Penaeus monodon*. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1784, 504–511.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2003a. Organization and nucleotide sequence of the European flat oyster *Ostrea edulis* heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes. *Aquat. Toxicol.* 65, 221–225.
- Boutet, I., Tanguy, A., Rousseau, S., Auffret, M., Moraga, D., 2003b. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Cell Stress Chaperones* 8, 76–85.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004a. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329, 147–157.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004b. Molecular identification and expression of two non-P450 enzymes, monoamine oxidase a and flavin-containing monooxygenase 2, involved in phase I of xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1679, 29–36.
- Boutet, I., Tanguy, A., Moraga, D., 2004c. Characterisation and expression of four mRNA sequences encoding glutathione S-transferases pi, mu, omega and sigma classes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to hydrocarbons and pesticides. *Mar. Biol.* 146, 53–64.
- Bower, S.M., Rodgers, C.J., 2001. Hazards and risk management of *Mikrocytos mackini* in oysters. *Risk Anal. Aquat. Anim. Heal. Proc.* 164–166.
- Box, A., Sureda, A., Deudero, S., 2009. Antioxidant response of the bivalve *Pinna nobilis* colonised by invasive red macroalgae *Lophocladia lallemandii*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 456–460.
- Brackley, K.I., Grantham, J., 2009. Activities of the chaperonin containing TCP-1 (CCT): implications for cell cycle progression and cytoskeletal organisation. *Cell Stress Chaperones* 14, 23–31.
- Brehélin, M., Bonami, J.R., Cousserans, F., Vivarès, C.P., 1982. True plasmodial forms exist in *Bonamia ostreae*, a pathogen of the european flat oyster *Ostrea edulis*. *C. R. Seances Acad. Sci. III.* 295, 45–48.
- Brennan, R.G., Vasu, S., Matthews, B.W., Otsuka, A.J., 1989. Crystallization of the bifunctional biotin operon repressor. *J. Biol. Chem.* 264, 5.
- Brennan, D.F., Dar, A.C., Hertz, N.T., Chao, W.C.H., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., Barford, D., 2011. A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK. *Nature* 472, 366–369.
- Bresler, V., Abelson, A., Fishelson, L., Feldstein, T., Rosenfeld, M., Mokady, O., 2003. Marine molluscs in environmental monitoring. *Helgol. Mar. Res.* 57, 157–165.
- Broberg, C. A., Zhang, L., Gonzalez, H., Laskowski-Arce, M. a, Orth, K., 2010. A *Vibrio* effector protein is an inositol phosphatase and disrupts host cell membrane integrity. *Science* 329, 1660–2.
- Brockhausen, I., Hull, E., Hindsgaul, O., Schachter, H., Shah, R.N., Michnick, S.W., Carver, J.P., 1989. Control of glycoprotein synthesis. Detection and characterization of a novel branching enzyme from hen oviduct, UDP-N-acetylglucosamine:GlcNAc beta 1-6 (GlcNAc beta 1-2)Man alpha-R (GlcNAc to Man) beta-4-N-

- acetylglucosaminyltransferase VI. *J. Biol. Chem.* 264, 11211–21.
- Brophy, P.M., Pritchard, D.I., 1992. Metabolism of lipid peroxidation products by the gastrointestinal nematodes *Necator americanus*, *Ancylostoma ceylanicum* and *Heligmosomoides polygyrus*. *Int. J. Parasitol.* 22, 1009–1012.
- Brown, K.L., Hancock, R.E.W., 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.*
- Browne, G.J., Proud, C.G., 2002. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 269, 5360–5368.
- Bruno, D.W., Turnbull, A., Fraser, D., 2007. The first occurrence of *Bonamia ostreae* in the native oyster, *Ostrea edulis*, in Loch Sunart Scotland. 13th Int. Conf. fish Shellfish Dis. 17th – 21st Sept.
- Bucke, D., 1988. Pathology of bonamiasis. *Parasitol. Today* 4, 174–6.
- Buckley, B.A., Somero, G.N., 2009. CDNA microarray analysis reveals the capacity of the cold-adapted Antarctic fish *Trematomus bernacchii* to alter gene expression in response to heat stress. *Polar Biol.* 32, 403–415.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L., Hoffmann, D., 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 329–344.
- Burreson, E.M., Ford, S.E., 2004. A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquat. Living Resour.* 17, 499–517.
- Burreson, E.M., Stokes, N.A., Carnegie, R.B., Bishop, M.J., 2004. *Bonamia* sp. (Haplosporidia) Found in Nonnative Oysters *Crassostrea ariakensis* in Bogue Sound, North Carolina. *J. Aquat. Anim. Health* 16, 1–9.
- Burreson, E.M., 2008. Misuse of PCR assay for diagnosis of mollusc protistan infections. *Dis. Aquat. Organ.* 80, 81–3.
- Bursch, W., 2001. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 8, 569–581.
- Butt, D., Raftos, D., 2008. Phenoloxidase-associated cellular defence in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, provides resistance against QX disease infections. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 299–306.
- Buttgereit, F., Burmester, G.R., Brand, M.D., 2000. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunol. Today* 21, 192–9.
- Cáceres-Martínez, J., Robledo, J.A.F., Figueras, A., 1995. Presence of *Bonamia* and its relation to age, growth rates and gonadal development of the flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Ria de Vigo, Galicia (NW Spain). *Aquaculture* 130, 15–23.
- Caizzi, R., Bozzetti, M.P., Caggese, C., Ritossa, F., 1990. Homologous nuclear genes encode cytoplasmic and mitochondrial glutamine synthetase in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 212, 17–26.
- Cajaraville, M.P., Pal, S.G., 1995. Morphofunctional Study of the Hemocytes of the Bivalve Mollusk *Mytilus galloprovincialis* with Emphasis on the Endolysosomal Compartment. *Cell Struct. Funct.* 20, 355–367.
- Cajaraville, M.P., Pal, S.G., Robledo, Y., 1995. Light and Electron Microscopical Localization of Lysosomal Acid Hydrolases in Bivalve Haemocytes by Enzyme Cytochemistry. *Acta Histochem. Cytochem.* 28, 409–416.
- Calvo, L.M.R., Calvo, G.W., Burreson, E.M., 2003. Dual disease resistance in a selectively bred eastern oyster, *Crassostrea virginica*, strain tested in Chesapeake Bay. *Aquaculture* 220, 69–87.
- Campalans, M., Lohrmann, K.B., 2009. Histological survey of four species of cultivated molluscs in Chile susceptible to OIE notifiable diseases. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 44,

- 561–569.
- Campbell, I.D., Bork, P., 1993. Epidermal growth factor-like modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.*
- Campos, E.G., Hamdan, F.F., 2000. Cloning of the chaperonin t-complex polypeptide 1 gene from *Schistosoma mansoni* and studies of its expression levels under heat shock and oxidative stress. *Parasitol. Res.* 86, 253–8.
- Campos, M.A., Almeida, I.C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E.P., Procópio, D.O., Travassos, L.R., Smith, J.A., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T., 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* 167, 416–423.
- Campos, A., Tedesco, S., Vasconcelos, V., Cristobal, S., 2012. Proteomic research in bivalves Towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. *J. Proteomics* 75, 4346–4359.
- Campos, A., Apraiz, I., da Fonseca, R.R., Cristobal, S., 2015. Shotgun analysis of the marine mussel *Mytilus edulis* hemolymph proteome and mapping the innate immunity elements. *Proteomics* 15, 4021–4029.
- Campos, A., Danielsson, G., Farinha, A.P., Kuruvilla, J., Warholm, P., Cristobal, S., 2016. Shotgun proteomics to unravel marine mussel (*Mytilus edulis*) response to long-term exposure to low salinity and propranolol in a Baltic Sea microcosm. *J. Proteomics* 137, 97–106.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P.G., 2004. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327–1333.
- Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Scarpato, A., Citterio, B., Pruzzo, C., Gallo, G., 2002a. Signaling pathways involved in the physiological response of mussel hemocytes to bacterial challenge: The role of stress-activated p38 MAP kinases. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 325–334.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C., 2002b. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Tech.* 57, 469–476.
- Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Citterio, B., Pruzzo, C., Gallo, G., 2003. Tyrosine kinase-mediated cell signalling in the activation of *Mytilus* hemocytes: Possible role of STAT-like proteins. *Biol. Cell* 95, 603–613.
- Canesi, L., Ciacci, C., Lorusso, L.C., Betti, M., Guarnieri, T., Tavolari, S., Gallo, G., 2006a. Immunomodulation by 17beta-estradiol in bivalve hemocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R664–R673.
- Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., 2006b. Cell signalling in the immune response of mussel hemocytes. *Invertebr. Surviv.* 40–49.
- Canton, J., Neculai, D., Grinstein, S., 2013. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 621–34.
- Cao, A., Ramos Martínez, J.I., Barcia, R., 2004a. In vitro effects of LPS, IL-2, PDGF and CRF on haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 215–225.
- Cao, A., Ramos Martínez, J.I., Barcia, R., 2004b. Implication of PKA and PKC in the activation of the haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. by LPS and IL-2 41, 45–52.
- Cao, A., Fuentes, J., Comesaña, P., Casas, S.M., Villalba, A., 2009. A proteomic approach envisaged to analyse the bases of oyster tolerance/resistance to bonamiosis. *Aquaculture* 295, 149–156.
- Cao, A., Villalba, A., 2011. Señalización celular en moluscos, Enfermedades de Moluscos



- Bivalvos de Interés En Acuicultura. pp. 445–479.
- Carballal, M., Lopez, M., Azevedo, C., Villalba, A., 1997a. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Dis. Aquat. Organ. 29, 127–135.
- Carballal, M., Lopez, M., Azevedo, C., Villalba, A., 1997b. Enzymes Involved in Defense Functions of Hemocytes of Mussel *Mytilus galloprovincialis*. J. Invertebr. Pathol. 70, 96–105.
- Carballal, M., Lopez, M., Azevedo, C., Villalba, A., 1997c. In vitro study of phagocytic ability of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. haemocytes. Fish Shellfish Immunol. 7, 403–416.
- Carlini, D.B., Reece, K.S., Graves, J.E., 2000. Actin gene family evolution and the phylogeny of coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda). Mol. Biol. Evol. 17, 1353–70.
- Carnegie, R.B., Barber, B.J., Culloty, S.C., Figueras, A.J., Distel, D.L., 2000. Development of a PCR assay for detection of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* and support for its inclusion in the Haplosporidia. Dis. Aquat. Organ. 42, 199–206.
- Carnegie, R.B., Barber, B.J., 2001. Growth and mortality of *Ostrea edulis* at two sites on the Damariscotta River estuary, Maine, USA. J. World Aquac. Soc. 32, 221–227.
- Carnegie, R.B., Barber, B.J., Distel, D.L., 2003. Detection of the oyster parasite *Bonamia ostreae* by fluorescent in situ hybridization. Dis. Aquat. Organ. 55, 247–252.
- Carnegie, R.B., Cochenne-Laureau, N., 2004. Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. Aquat. Living Resour. 17, 519–528.
- Carnegie, R.B., Burreson, E.M., Hine, P.M., Stokes, N. A, Audemard, C., Bishop, M.J., Peterson, C.H., 2006. *Bonamia perspora* n. sp. (Haplosporidia), a parasite of the oyster *Ostrea equestris*, is the first *Bonamia* species known to produce spores. J. Eukaryot. Microbiol. 53, 232–45.
- Carnegie, R.B., Hill, K.M., Stokes, N.A., Burreson, E.M., 2014. The haplosporidian *Bonamia exitiosa* is present in Australia, but the identity of the parasite described as *Bonamia* (formerly *Mikrocytos*) *roughleyi* is uncertain. J. Invertebr. Pathol. 115, 33–40.
- Carpentier, S.C., Coemans, B., Podevin, N., Laukens, K., Witters, E., Matsumura, H., Terauchi, R., Swennen, R., Panis, B., 2008. Functional genomics in a non-model crop: Transcriptomics or proteomics? Physiol. Plant.
- Carranza, A., Defeo, O., Beck, M., Castilla, J.C., 2009. Linking fisheries management and conservation in bioengineering species: The case of South American mussels (Mytilidae). Rev. Fish Biol. Fish. 19, 349–366.
- Carrasco, N., Villalba, A., Andree, K.B., Engelsma, M.Y., Lacuesta, B., Ramilo, A., Gairín, I., Furones, M.D., 2012. *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) observed infecting the European flat oyster *Ostrea edulis* cultured on the Spanish Mediterranean coast. J. Invertebr. Pathol. 110, 307–13.
- Carroll, M.A., Catapano, E.J., 2007. The nervous system control of lateral ciliary activity of the gill of the bivalve mollusc, *Crassostrea virginica*. Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol. 148, 445–450.
- Casas, S.M., Grau, A., Reece, K.S., Apakupakul, K., Azevedo, C., Villalba, A., 2004. *Perkinsus mediterraneus* n. sp., a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis* from the Balearic Islands, Mediterranean Sea. Dis. Aquat. Organ. 58, 231–244.
- Casas, S.M., Reece, K.S., Li, Y., Moss, J.A., Villalba, A., La Peyre, J.F., 2008. Continuous culture of *Perkinsus mediterraneus*, a parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis*, and characterization of its morphology, propagation, and extracellular proteins in vitro. J. Eukaryot. Microbiol. 55, 34–43.
- Castellanos-Martínez, S., Arteta, D., Catarino, S., Gestal, C., 2014a. De Novo Transcriptome Sequencing of the *Octopus vulgaris* Hemocytes Using Illumina RNA-Seq Technology:

- Response to the Infection by the Gastrointestinal Parasite *Aggregata octopiana*. PLoS One 9, e107873.
- Castellanos-Martínez, S., Diz, A.P., Álvarez-Chaver, P., Gestal, C., 2014b. Proteomic characterization of the hemolymph of *Octopus vulgaris* infected by the protozoan parasite *Aggregata octopiana*. J. Proteomics 105, 151–163.
- Castilla, J.C., Gelcich, S., Defeo, O., 2007. Successes, Lessons, and Projections from Experience in Marine Benthic Invertebrate Artisanal Fisheries in Chile, in: Fisheries Management: Progress Towards Sustainability. Blackwell Publishing Ltd, pp. 23–42.
- Cavallaro, R.A., Fuso, A., Nicolia, V., Scarpa, S., 2010. S-adenosylmethionine prevents oxidative stress and modulates glutathione metabolism in TgCRND8 mice fed a B-vitamin deficient diet. J. Alzheimers. Dis. 20, 997–1002.
- Celada, A., Nathan, C., 1994. Macrophage activation revisited. Immunol. Today.
- Cellura, C., Toubiana, M., Parrinello, N., Roch, P., 2007. Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. Fish Shellfish Immunol. 22, 340–350.
- Cerenius, L., Söderhäll, K., 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunol. Rev.
- Cerenius, L., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. Trends Immunol. 29, 263–71.
- Cerenius, L., Kawabata, S., Ichiro, Lee, B.L., Nonaka, M., Söderhäll, K., 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. Trends Biochem. Sci.
- Cerutti, H., Casas-Mollano, J.A., 2006. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. Curr. Genet. 50, 81–99.
- Chagot, D., Boulo, V., Hervio, D., Mialhe, E., Bachere, E., Mourton, C., Grizel, H., 1992. Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): Entry mechanisms. J. Invertebr. Pathol. 59, 235–240.
- Chai, Y.-M., Yu, S.-S., Zhao, X.-F., Zhu, Q., Wang, J.-X., 2010. Comparative proteomic profiles of the hepatopancreas in *Fenneropenaeus chinensis* response to white spot syndrome virus. Fish Shellfish Immunol. 29, 480–6.
- Chakravorty, D., Hensel, M., 2003. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. Microbes Infect.
- Chakravarty, V., Cronan, J.E., 2013. The Wing of a Winged Helix-Turn-Helix Transcription Factor Organizes the Active Site of BirA, a Bifunctional Repressor/Ligase 288, 36029–36039.
- Chamrad, D.C., Körting, G., Stühler, K., Meyer, H.E., Klose, J., Blüggel, M., 2004. Evaluation of algorithms for protein identification from sequence databases using mass spectrometry data. Proteomics 4, 619–628.
- Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature 410, 37–40.
- Chang, S., Tseng, S., Chou, H., 2005. Morphological characterization via light and electron microscopy of the hemocytes of two bivalves: a comparison study between the hard clam (*Meterix lusoria*) and the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Zool. Stud. 44, 144–152.
- Chapman-Smith, A., Cronan, J.E., 1999. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity 4, 359–363.
- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Bulet, P., 1996. Innate immunity: Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. J. Biol. Chem. 271, 21808–21813.
- Chase, M.R., Raina, K., Bruno, J., Sugumaran, M., 2000. Purification, characterization and



- molecular cloning of prophenoloxidases from *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 953–67.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C., 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.*
- Chen, Z.T., Li, S.L., Cai, E.Q., Wu, W.L., Jin, J.S., Zhu, B., 2003. LPS induces pulmonary intravascular macrophages producing inflammatory mediators via activating NF- $\kappa$ B. *J. Cell. Biochem.* 89, 1206–1214.
- Chen, M., Tominaga, K., Pereira-smith, O.M., 2010. Emerging role of the MORF / MRG gene family in various biological processes , including aging 1197, 134–141.
- Chen, J., Xiao, S., Yu, Z., 2011. F-type lectin involved in defense against bacterial infection in the pearl oyster (*Pinctada martensii*). *Fish Shellfish Immunol.* 30, 750–754.
- Chen, G., Zhang, C., Li, C., Wang, C., Xu, Z., Yan, P., 2011. Haemocyte protein expression profiling of scallop *Chlamys farreri* response to acute viral necrosis virus (AVNV) infection. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1135–1145.
- Chen, H., Wang, L., Zhou, Z., Hou, Z., Liu, Z., Wang, W., Gao, D., Gao, Q., Wang, M., Song, L., 2015. The comprehensive immunomodulation of NeurimmiRs in haemocytes of oyster *Crassostrea gigas* after acetylcholine and norepinephrine stimulation. *BMC Genomics* 16, 942.
- Chen, H., Zhou, Z., Wang, L., Wang, H., Liu, R., Zhang, H., Song, L., 2016. An invertebrate-specific miRNA targeted the ancient cholinergic neuroendocrine system of oyster. *Open Biol.* 6.
- Cheng, T.C., Rodrick, G.E., 1975. Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 52, 443–447.
- Cheng, T.C., Rodrick, G.E., Foley, D.A., Koehler, S.A., 1975. Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.* 25, 261–265.
- Cheng, T.C., 1981. Bivalves. *Invertebrate Blood Cells*. London: Academic Press.
- Cheng, T.C., Howland, K.H., 1982. Effects of colchicine and cytochalasin B on chemotaxis of oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*
- Cheng, T.C., 1983. The role of lysosomes in molluscan inflammation. *Integr. Comp. Biol.* 23, 129–144.
- Cheng, T.C., 1986. Specificity and the role of lysosomal hydrolases in molluscan inflammation. *Int. J. Tissue React.* 8, 439–445.
- Cheng, T.C., 1992. Selective induction of release of hydrolases from *Crassostrea virginica* hemocytes by certain bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* 59, 197–200.
- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: forms and functions, The Easter. ed. Maryland Sea Grant Book, College Park, MD, USA.
- Cheng, T.C., 2000. Cellular defense mechanisms in oysters. *Recent Advances in Marine Biotechnology*. Science Publishers, Enfield, NH, USA.
- Cherkasov, A.S., Grewal, S., Sokolova, I.M., 2007. Combined effects of temperature and cadmium exposure on haemocyte apoptosis and cadmium accumulation in the eastern oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). *J. Therm. Biol.* 32, 162–170.
- Chiron, H., Drouet, A., Claudot, A.C., Eckerskorn, C., Trost, M., Heller, W., Ernst, D., Sandermann, H., 2000. Molecular cloning and functional expression of a stress-induced multifunctional O-methyltransferase with pinosylvin methyltransferase activity from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Mol. Biol.* 44, 733–45.
- Chiu, Y.-H., Macmillan, J.B., Chen, Z.J., 2009. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138, 576–91.

- Choi, S.H., Jee, B.Y., Lee, S.J., Cho, M.Y., Lee, S.J., Kim, J.W., Jeong, H. Do, Kim, K.H., 2013. Effects of RNA interference-mediated knock-down of hypoxia-inducible factor- $\alpha$  on respiratory burst activity of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 476–479.
- Chora, S., Starita-Geribaldi, M., Guignonis, J.-M., Samson, M., Roméo, M., Bebianno, M.J., 2009. Effect of cadmium in the clam *Ruditapes decussatus* assessed by proteomic analysis. *Aquat. Toxicol.* 94, 300–308.
- Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N.T., Hoffmann, J.A., Kanzok, S.M., Letunic, I., Levashina, E.A., Loukeris, T.G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L.F., Müller, H.-M., Osta, M.A., Paskewitz, S.M., Reichhart, J.-M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K.D., Vlachou, D., Volz, J., von Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P., Kafatos, F.C., 2002. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 159–165.
- Chu, F.-L.E., La Peyre, J.F., Burreson, C.S., 1993. *Perkinsus marinus* infection and potential defense-related activities in Eastern Oysters, *Crassostrea virginica*: salinity effects. *J. Invertebr. Pathol.* 62, 226–232.
- Chu, F.L.E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. *Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and Pathology.*, Enfield (NH), USA; Plymouth, UK.
- Chwieralski, C.E., Welte, T., Buhling, F., 2006. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis* 11, 143–149.
- Ciechanover, A., Orian, A., Schwartz, A.L., 2000. Ubiquitin-mediated proteolysis: Biological regulation via destruction. *BioEssays* 22, 442–451.
- Cigarria, J., Elston, R., 1997. Independent introduction of *Bonamia ostreae*, a parasite of *Ostrea edulis*, to Spain. *Dis. Aquat. Org.* 29, 157–158.
- Cima, F., Matozzo, V., Marin, M.G., Ballarin, L., 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 677–693.
- Circu, M.L., Yee Aw, T., 2008. Glutathione and apoptosis. *Free Radic. Res.* 42, 689–706.
- Clapéron, A., Therrien, M., 2007. KSR and CNK: two scaffolds regulating RAS-mediated RAF activation. *Oncogene* 26, 3143–3158.
- Clark, M.S., Thorne, M. a S., Amaral, A., Vieira, F., Batista, F.M., Reis, J., Power, D.M., 2013. Identification of molecular and physiological responses to chronic environmental challenge in an invasive species: The Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecol. Evol.* 3, 3283–3297.
- Clauser, K.R., Baker, P., Burlingame, A.L., 1999. Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal. Chem.* 71, 2871–2882.
- Cloutier, M., Wellstead, P., 2010. The control systems structures of energy metabolism. *J. R. Soc. Interface* 7, 651–65.
- Cochennec-Laureau, N., Auffret, M., Renault, T., Langlade, A., 2003a. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *J. Invertebr. Pathol.* 83, 23–30.
- Cochennec-Laureau, N., Reece, K.S., Berthe, F.C.J., Hine, P.M., 2003b. Mikrocytos roughleyi taxonomic affiliation leads to the genus Bonamia (Haplosporidia). *Dis. Aquat. Organ.* 54, 209–17.
- Cochennec, N., Hervio, D., Panatier, B., Boulo, V., Mialhe, E., Rogier, H., Grizel, H., Paolucci, F., 1992. A direct monoclonal antibody sandwich immunoassay for detection of *Bonamia ostreae* (Asctospora) in hemolymph samples of the flat oyster *Ostrea*

- edulis* (Mollusca Bivalvia). Dis. Aquat. Organ.
- Cochennec, N., Renault, T., Chollet, B., Maffart, P., 1995. Comparison of haemograms from resistant and susceptible European flat oysters, *Ostrea edulis*, exposed to the parasite *Bonamia ostreae*, in: Eur. Assoc. Fish Pathologists. Palma de Mallorca, Spain, p. 17.
- Cochennec, N., Le Roux, F., Berthe, F., Gerard, A., 2000. Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. J. Invertebr. Pathol. 76, 26–32.
- Coen, L.D., Luckenbach, M.W., Breitburg, D.L., 1998. The Role of Oyster Reefs as Essential Fish Habitat: a Review of Current Knowledge and Some New Perspectives. Fish Habitat Essent. Fish Habitat Rehabil. 22, 438–454.
- Cohen, A.N., 1998. Accelerating Invasion Rate in a Highly Invaded Estuary. Science (80).
- Cohen, S.M., Chastain, P.D., Cordeiro-Stone, M., Kaufman, D.G., 2009. DNA replication and the GINS complex: localization on extended chromatin fibers. Epigenetics Chromatin 2, 6.
- Colinge, J., Masselot, A., Giron, M., Dessingy, T., Magnin, J., 2003. OLAV: Towards high-throughput tandem mass spectrometry data identification, in: Proteomics. pp. 1454–1463.
- Comesaña, P., Casas, S.M., Cao, A., Abollo, E., Arzul, I., Morga, B., Villalba, A., 2012. Comparison of haemocytic parameters among flat oyster *Ostrea edulis* stocks with different susceptibility to bonamiosis and the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. J. Invertebr. Pathol. 109, 274–86.
- Comesaña Lestayo, M.P., 2008. Comparación de parámetros inmunológicos entre poblaciones de *Ostrea edulis* con diferente susceptibilidad a la bonamiosis y la especie resistente *Crassostrea gigas*. Santiago de Compostela.
- Comps, M., Tigé, G., Grizel, H., 1980. Etude ultrastructurale d'un Protiste parasite de l'Huître *Ostrea edulis* L. C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D. 383–384.
- Comps, M., 1983. Recherches histologiques et cytologiques sur les infections intracellulaires des mollusques bivalves marins. Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- Comps, M., Cochennec, N., 1993. A herpes-like virus from the European oyster *Ostrea edulis* L. J. Invertebr. Pathol. 62, 201–203.
- Cong, R., Sun, W., Liu, G., Fan, T., Meng, X., Yang, L., Zhu, L., 2005. Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. Fish Shellfish Immunol. 18, 61–70.
- Contardo-Jara, V., Krueger, A., Exner, H.-J., Wiegand, C., 2009. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Dreissena polymorpha* for detection of site impact in watercourses of Berlin. J. Environ. Monit. 11, 1147–1156.
- Conte, A., Ottaviani, E., 1995. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. FEBS Lett. 365, 120–124.
- Conus, S., Simon, H.-U., 2008. Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. Biochem. Pharmacol. 76, 1374–1382.
- Corbeil, S., Arzul, I., Robert, M., Berthe, F.C.J., Besnard-Cochennec, N., Crane, M.S.J., 2006. Molecular characterisation of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. Dis. Aquat. Organ. 71, 81–5.
- Corporeau, C., Vanderplancke, G., Boulais, M., Suquet, M., Quéré, C., Boudry, P., Huvet, A., Madec, S., 2012. Proteomic identification of quality factors for oocytes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. J. Proteomics 75, 5554–5563.
- Corporeau, C., Tamayo, D., Pernet, F., Quéré, C., Madec, S., Marin, E., 2014. Proteomic signatures of the oyster metabolic response to herpesvirus OsHV-1  $\gamma$  Var infection. J. Proteomics 109, 176–187.
- Costa, M., Novoa, B., Figueras, A., 2008. Influence of beta-glucans on the immune responses

- of carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Fish Shellfish Immunol.* 24, 498–505.
- Costa, M.M., Dios, S., Alonso-Gutierrez, J., Romero, A., Novoa, B., Figueras, A., 2009a. Evidence of high individual diversity on myticin C in mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Dev. Comp. Immunol.* 33, 162–170.
- Costa, M.M., Prado-Alvarez, M., Gestal, C., Li, H., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A., 2009b. Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 515–523.
- Court, N.W., Ingley, E., Klinken, S.P., Bogoyevitch, M.A., 2005. Outer membrane protein 25-a mitochondrial anchor and inhibitor of stress-activated protein kinase-3. *Biochim. Biophys. Acta* 1744, 68–75.
- Coyne, V.E., 2011. The importance of ATP in the immune system of molluscs. *Invertebr. Surviv. J.* 48–55.
- Craig, R., Beavis, R.C., 2004. TANDEM: Matching proteins with tandem mass spectra. *Bioinformatics* 20, 1466–1467.
- Cranfield, H.J., 1975. The ultrastructure and histochemistry of the larval cement of *Ostrea edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 55, 497.
- Cranfield, H., Dunn, A., Doonan, I., Michael, K., 2005. *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. *ICES J. Mar. Sci.* 62, 3–13.
- Creagh, E.M., Conroy, H., Martin, S.J., 2003. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol. Rev.*
- Crocker, B.A., Kiu, H., Nicholson, S.E., 2008. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19, 414–22.
- Cronin, M.A., Culloty, S.C., Mulcahy, M.F., 2001. Lysozyme activity and protein concentration in the haemolymph of the flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Fish Shellfish Immunol.* 11, 611–22.
- Cui, S., Zhang, D., Jiang, S., Pu, H., Hu, Y., Guo, H., Chen, M., Su, T., Zhu, C., 2011. A macrophage migration inhibitory factor like oxidoreductase from pearl oyster *Pinctada fucata* involved in innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 173–181.
- Culloty, S.C., Mulcahy, M.F., 1996. Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiasis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. *Aquaculture* 144, 53–63.
- Culloty, S.C., Novoa, B., Pernas, M., Longshaw, M., Mulcahy, M.F., Feist, S.W., Figueras, A., 1999. Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. *Dis. Aquat. Organ.* 37, 73–80.
- Culloty, S.C., Cronin, M.A., Mulcahy, M.F., 2001. An investigation into the relative resistance of Irish flat oysters *Ostrea edulis* L. to the parasite *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980). *Aquaculture* 199, 229–244.
- Culloty, S.C., Duggan, P.F., Quishi, X., Mulcahy, M.F., 2002. Amylase and aspartate aminotransferase in the haemolymph of the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 367–369.
- Culloty, S.C., Cronin, M.A., Mulcahy, M.F., 2004. Potential resistance of a number of populations of the oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture* 237, 41–58.
- Czar, M.J., Welsh, M.J., Pratt, W.B., 1996. Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton. *Eur J Cell Biol* 70, 322–330.

- da Silva, P.M., Villalba, A., 2004. Comparison of light microscopic techniques for the diagnosis of the infection of the European flat oyster *Ostrea edulis* by the protozoan *Bonamia ostreae*. *J. Invertebr. Pathol.* 85, 97–104.
- da Silva, P.M., Fuentes, J., Villalba, A., 2005. Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on-growing in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). *Mar. Biol.* 147, 965–977.
- da Silva, P.M., Renault, T., Fuentes, J., Villalba, A., da Silva, P.M., 2008a. Herpesvirus infection in European flat oysters *Ostrea edulis* obtained from brood stocks of various geographic origins and grown in Galicia (NW Spain). *Dis. Aquat. Organ.* 78, 181–8.
- da Silva, P.M., Comesaña, P., Fuentes, J., Villalba, A., 2008b. Variability of haemocyte and haemolymph parameters in European flat oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins and relation with infection by the protozoan *Bonamia ostreae*. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 551–63.
- da Silva, P.M., Fuentes, J., Villalba, A., 2009. Differences in gametogenic cycle among strains of the European flat oyster *Ostrea edulis* and relationship between gametogenesis and bonamiosis. *Aquaculture* 287, 253–265.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Milzani, A., Di Simplicio, P., Colombo, R., 2001. The actin cytoskeleton response to oxidants: From small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1624–1632.
- Damiens, G., His, E., Gnassia-Barelli, M., Quiniou, F., Roméo, M., 2004. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 138, 121–128.
- Das, A., Base, C., Dhulipala, S., Dubreuil, R.R., 2006. Spectrin functions upstream of ankyrin in a spectrin cytoskeleton assembly pathway. *J. Cell Biol.* 175, 325–335.
- Davicino, R.C., Eliçabe, R.J., Di Genaro, M.S., Rabinovich, G.A., 2011. Coupling pathogen recognition to innate immunity through glycan-dependent mechanisms. *Int. Immunopharmacol.*
- David, E., Tanguy, A., Pichavant, K., Moraga, D., 2005. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia exposure under experimental conditions. *FEBS J.* 272, 5635–52.
- David, E., Tanguy, A., Moraga, D., 2012. Characterisation and genetic polymorphism of metallothionein gene CgMT4 in experimental families of Pacific oyster *Crassostrea gigas* displaying summer mortality. *Biomarkers* 17, 85–95.
- Davis, C. V., Barber, B.J., 1999. Growth and survival of selected lines of eastern oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) affected by juvenile oyster disease. *Aquaculture* 178, 253–271.
- Dayton, P.K., Thrush, S.F., Agardy, M.T., Hofman, R.J., 1995. Environmental effects of marine fishing. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 5, 205–232.
- DeAngelis, D.L., 1986. Positive feedback in natural systems.
- de Hoffmann, E., Stroobant, V., 2007. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Third Edit. ed. Copyright ©2007 John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England, Université Catholique de Louvain, Belgium & Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels, Belgium.
- Deiana, S., Platt, B., Riedel, G., 2011. The cholinergic system and spatial learning. *Behav. Brain Res.* 221, 389–411.
- De La Fuente, M., Borrajo, A., Bermúdez, J., Lores, M., Alonso, J., López, M., Santalla, M., De Ron, A.M., Zapata, C., Alvarez, G., 2011. 2-DE-based proteomic analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds. *J. Proteomics* 74, 262–7.



- de Lorgeril, J., Zenagui, R., Rosa, R.D., Piquemal, D., Bachère, E., 2011. Whole Transcriptome Profiling of Successful Immune Response to *Vibrio* Infections in the Oyster *Crassostrea gigas* by Digital Gene Expression Analysis. *PLoS One* 6, e23142.
- De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Elenko, E., Farquhar, M.G., 2000. The regulator of G protein signaling family. *Annu. Toxicol.*
- De Zoysa, M., Lee, J., 2007. Molecular cloning and expression analysis of interferon inducible lysosomal thiol reductase (GILT)-like cDNA from disk abalone (*Haliotis discus discus*). *J. Invertebr. Pathol.* 96, 221–229.
- De Zoysa, M., Pushpamali, W.A., Whang, I., Kim, S.J., Lee, J., 2008. Mitochondrial thioredoxin-2 from disk abalone (*Haliotis discus discus*): Molecular characterization, tissue expression and DNA protection activity of its recombinant protein. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 149, 630–639. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.12.009>
- De Zoysa, M., Jung, S., Lee, J., 2009a. First molluscan TNF-alpha homologue of the TNF superfamily in disk abalone: Molecular characterization and expression analysis. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 625–631.
- De Zoysa, M., Whang, I., Lee, Y., Lee, S., Lee, J.S., Lee, J., 2009b. Transcriptional analysis of antioxidant and immune defense genes in disk abalone (*Haliotis discus discus*) during thermal, low-salinity and hypoxic stress. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 154, 387–395.
- Dégremont, L., Garcia, C., Allen, S.K., 2015a. Genetic improvement for disease resistance in oysters: A review. *J. Invertebr. Pathol.* 131, 226–241.
- Dégremont, L., Lamy, J.B., Pépin, J.F., Travers, M.A., Renault, T., 2015b. New insight for the genetic evaluation of resistance to ostreid herpesvirus infection, a worldwide disease, in *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 10, 1–12.
- Dégremont, L., Nourry, M., Maurouard, E., 2015c. Mass selection for survival and resistance to OsHV-1 infection in *Crassostrea gigas* spat in field conditions: Response to selection after four generations. *Aquaculture* 446, 111–121.
- Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q., Cheng, G., 2003. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.*
- Dermine, J.-F.-F., Desjardins, M., 1999. Survival of intracellular pathogens within macrophages. *Protoplasma* 210, 11–24.
- Deveraux, Q.L., Leo, E., Stennicke, H.R., Welsh, K., Salvesen, G.S., Reed, J.C., 1999. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J.*
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, J.C., 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300–304.
- Dheilly, N.M., Haynes, P.A., Bove, U., Nair, S. V., Raftos, D.A., 2011. Comparative proteomic analysis of a sea urchin (*Haliocidaris erythrogramma*) antibacterial response revealed the involvement of apextrin and calreticulin. *J. Invertebr. Pathol.* 106, 223–229.
- Dheilly, N.M., Haynes, P.A., Raftos, D.A., Nair, S. V., 2012. Time course proteomic profiling of cellular responses to immunological challenge in the sea urchin, *Haliocidaris erythrogramma*. *Dev. Comp. Immunol.* 37, 243–256. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.03.006>
- Dheilly, N.M., Raftos, D. a, Haynes, P. a, Smith, L.C., Nair, S. V., 2013. Shotgun proteomics of coelomic fluid from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Comp. Immunol.* 40, 35–50.
- Di-Giulio, T., Washburn, C., Wenning, R.J., Carolina, N., Winston, G., Jewell, C., 1989.

- Biochemicals responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chemistry* 8, 1103–1123.
- di Salvo, M.L., Safo, M.K., Musayev, F.N., Bossa, F., Schirch, V., 2003. Structure and mechanism of *Escherichia coli* pyridoxine 5'-phosphate oxidase. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1647, 76–82.
- Díaz, S., Cao, a., Villalba, a., Carballal, M.J., 2010. Expression of mutant protein p53 and Hsp70 and Hsp90 chaperones in cockles *Cerastoderma edule* affected by neoplasia. *Dis. Aquat. Organ.* 90, 215–222.
- Ding, J., Wang, R., Yang, F., Zhao, L., Qin, Y., Zhang, G., Yan, X., 2014. Identification and characterization of a novel phage-type like lysozyme from Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Dev. Comp. Immunol.* 47, 81–9.
- Diz, A.P., Martínez-Fernández, M., Rolán-Alvarez, E., 2012a. Proteomics in evolutionary ecology: Linking the genotype with the phenotype. *Mol. Ecol.*
- Diz, A.P., Dudley, E., Skibinski, D.O.F., 2012b. Identification and characterization of highly expressed proteins in sperm cells of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Proteomics* 12, 1949–56.
- Diz, A.P., Dudley, E., Cogswell, A., MacDonald, B.W., Kenchington, E.L.R., Zouros, E., Skibinski, D.O.F., 2013. Proteomic analysis of eggs from *Mytilus edulis* females differing in mitochondrial DNA transmission mode. *Mol. Cell. Proteomics* 12, 3068–80.
- Dodds, A.W., Matsushita, M., 2007. The phylogeny of the complement system and the origins of the classical pathway. *Immunobiology* 212, 233–243.
- Doi, K., Fujimoto, T., Koyanagi, M., Tsunoda, T., Tanaka, Y., Yoshida, Y., Takashima, Y., Kuroki, M., Sasazuki, T., Shirasawa, S., 2011. ZFAT is a critical molecule for cell survival in mouse embryonic fibroblasts. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 16, 89–100.
- Donaghy, L., Lambert, C., Choi, K.-S., Soudant, P., 2009a. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. *Aquaculture* 297, 10–24.
- Donaghy, L., Kim, B.K., Hong, H.K., Park, H.S., Choi, K.S., 2009b. Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 296–301.
- Donaghy, L., Volety, A.K., 2011. Functional and metabolic characterization of hemocytes of the green mussel, *Perna viridis*: In vitro impacts of temperature. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 808–814.
- Donaghy, L., Kraffe, E., Le Goïc, N., Lambert, C., Volety, A.K., Soudant, P., 2012. Reactive oxygen species in unstimulated hemocytes of the pacific oyster *Crassostrea gigas*: a mitochondrial involvement. *PLoS One* 7, e46594.
- Donnelly, S., Dalton, J.P., Robinson, M.W., 2011. How pathogen-derived cysteine proteases modulate host immune responses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 712, 192–207.
- Doonan, I.J., Cranfield, H.J., Michael, K.P., 1994. Catastrophic reduction of the oyster, *Tiostrea chilensis* (Bivalvia: Ostreidae), in Foveaux Strait, New Zealand, due to infestation by the protistan *Bonamia* sp. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 28, 335–344.
- Dopic, J., Skarp, K.-P., Kaisa Rajakyla, E., Tanhuanpaa, K., Vartiainen, M.K., 2012. Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- Dorrington, T., Villamil, L., Gómez-chiarri, M., 2011. Upregulation in response to infection and antibacterial activity of oyster histone H4. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 94–101.
- Doussau, F., Augustine, G.J., 2000. The actin cytoskeleton and neurotransmitter release: An overview. *Biochimic.*



- Dove, M.C., Nell, J.A., Mcorrie, S., O'connor, W.A., 2013a. Assessment of Qx and Winter Mortality Disease Resistance of Mass Selected Sydney Rock Oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850), in the Hawkesbury River and Merimbula Lake, NSW Australia. *J. Shellfish Res.* 32, 681–687.
- Dove, M.C., Nell, J.A., O'Connor, W.A., 2013b. Evaluation of the progeny of the fourth-generation Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) breeding lines for resistance to QX disease (*Marteilia sydneyi*) and winter mortality (*Bonamia roughleyi*). *Aquac. Res.* 44, 1791–1800.
- Dowd, W.W., 2012. Challenges for biological interpretation of environmental proteomics data in non-model organisms, in: *Integrative and Comparative Biology*. pp. 705–720.
- Dowling, V., Hoarau, P.C., Romeo, M., O'Halloran, J., Van Pelt, F., O'Brien, N., Sheehan, D., 2006. Protein carbonylation and heat shock response in *Ruditapes decussatus* following p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure: A proteomic approach reveals that DDE causes oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 77, 11–18.
- Dremina, E.S., Sharov, V.S., Schöneich, C., 2005. Protein tyrosine nitration in rat brain is associated with raft proteins, flotillin-1 and  $\alpha$ -tubulin: effect of biological aging. *J. Neurochem.* 93, 1262–1271.
- Du, Y., Zhang, L., Xu, F., Huang, B., Zhang, G., Li, L., 2013. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying gene expression during Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) development by quantitative real-time PCR. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 939–945.
- Duan, Y., Liu, P., Li, J., Wang, Y., Li, J., Chen, P., 2014. A farnesoic acid O-methyltransferase (FAMeT) from *Exopalaemon carinicauda* is responsive to *Vibrio anguillarum* and WSSV challenge. *Cell Stress Chaperones* 19, 367–77.
- Dumbauld, B.R., Ruesink, J.L., Rumrill, S.S., 2009. The ecological role of bivalve shellfish aquaculture in the estuarine environment: A review with application to oyster and clam culture in West Coast (USA) estuaries. *Aquaculture* 290, 196–223.
- Dungan, C.F., Carnegie, R.B., Hill, K.M., McCollough, C.B., Laramore, S.E., Kelly, C.J., Stokes, N.A., Scarpa, J., 2012. Diseases of oysters *Crassostrea ariakensis* and *C. virginica* reared in ambient waters from the Choptank River, Maryland and the Indian River Lagoon, Florida. *Dis. Aquat. Organ.* 101, 173–183.
- Dunne, J.A., Lafferty, K.D., Dobson, A.P., Hechinger, R.F., Kuris, A.M., Martinez, N.D., McLaughlin, J.P., Mouritsen, K.N., Poulin, R., Reise, K., Stouffer, D.B., Thielges, D.W., Williams, R.J., Zander, C.D., 2013. Parasites Affect Food Web Structure Primarily through Increased Diversity and Complexity. *PLoS Biol.* 11.
- Dyachuk, V., Odintsova, N., 2009. Development of the larval muscle system in the mussel *Mytilus trossulus* (Mollusca, Bivalvia): Original Article. *Dev. Growth Differ.* 51, 69–79.
- Dyachuk, V.A., 2016. Hematopoiesis in Bivalvia larvae: Cellular origin, differentiation of hemocytes, and neoplasia. *Dev. Comp. Immunol.* 65, 253–257.
- Dyrynda, E.A., Pipe, R.K., Burt, G.R., Ratcliffe, N.A., 1998. Modulations in the immune defences of mussels (*Mytilus edulis*) from contaminated sites in the UK. *Aquat. Toxicol.* 42, 169–185.
- Dyrynda, E.A., Law, R.J., Dyrynda, P.E.J., Kelly, C.A., Pipe, R.K., Ratcliffe, N.A., 2000. Changes in immune parameters of natural mussel *Mytilus edulis* populations following a major oil spill ('Sea Empress', Wales, UK). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 206, 155–170.
- Dzeja, P.P., Zeleznikar, R.J., Goldberg, N.D., 1998. Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes. *Mol. Cell. Biochem.* 184, 169–82.

- Dzeja, P., Terzic, A., 2009. Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 1729–72.
- Dziembowski, A., Seraphin, B., 2004. Recent developments in the analysis of protein complexes. *FEBS Lett* 556, 1–6.
- Edinger, A.L., Thompson, C.B., 2004. Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.*
- Ehrenshaft, M., Bilski, P., Li, M.Y., Chignell, C.F., Daub, M.E., 1999. A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B6 biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9374–8.
- Ejiri, S., 2002. Moonlighting Functions of Polypeptide Elongation Factor 1: From Actin Bundling to Zinc Finger Protein R1-Associated Nuclear Localization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1–21.
- El-Anead, A., Cohen, A., Banoub, J., 2009. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Appl. Spectrosc. Rev.*
- Elliott, J., Johnston, J.A., 2004. SOCS: Role in inflammation, allergy and homeostasis. *Trends Immunol.*
- Ellis, R.J., Van der Vies, S.M., 1991. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 321–47.
- Ellis, R.P., Parry, H., Spicer, J.I., Hutchinson, T.H., Pipe, R.K., Widdicombe, S., 2011. Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. *Fish Shellfish Immunol.*
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- Elston, R.A., Wilkinson, M.T., 1985. Pathology, management and diagnosis of oyster velar virus disease (OVVD). *Aquaculture* 48, 189–210.
- Elston, R., Farley, C., Kent, M., 1986. Occurrence and significance of bonamiasis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Dis. Aquat. Organ.*
- Elston, R.A., Kent, M.L., Wilkinson, M.T., 1987. Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. *Aquaculture.*
- Endo, Y., Takahashi, M., Fujita, T., 2006. Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology.*
- Endo, H., Hashimoto, N., Isowa, Y., Kinoshita, S., Kotaki, T., Masaoka, T., Miki, T., Nakayama, S., Notazawa, A., Ohmori, F., Sarashina, I., Suzuki, M., Takagi, R., Takahashi, J., Takeuchi, T., Yokoo, N., Satoh, N., Toyohara, H., Wada, H., Samata, T., Endo, K., Nagasawa, H., Watabe, S., 2013. The Diversity of Shell Matrix Proteins: Genome-Wide Investigation of the Pearl Oyster, *Pinctada fucata*.
- Eng, J.K., McCormack, A.L., Yates, J.R., 1994. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5, 976–89.
- Engelsma, M., Culloty, S., Lynch, S., Arzul, I., Carnegie, R., 2014. Bonamia parasites: a rapidly changing perspective on a genus of important mollusc pathogens. *Dis. Aquat. Organ.* 110, 5–23.
- Esch, G., Bush, A., Aho, J., 1990. Parasite Communities: patterns and processes. London, UK.
- Esch, G.W., Fernández, J.C., 1993. A Functional Biology of Parasitism, in: A Functional Biology of Parasitism. Chapman & Hall, pp. 120–147.
- Estévez-Calvar, N., Romero, A., Figueras, A., Novoa, B., 2011. Involvement of pore-forming molecules in immune defense and development of the Mediterranean mussel (*Mytilus*

- galloprovincialis*). Dev. Comp. Immunol. 35, 1017–1031.
- Estrada, N., Velázquez, E., Rodríguez-Jaramillo, C., Ascencio, F., 2013. Morphofunctional study of hemocytes from lions-paw scallop *Nodidipeten subnodosus*. Immunobiology 218, 1093–1103.
- Evariste, L., Auffret, M., Audonnet, S., Geffard, A., David, E., Brousseau, P., Fournier, M., Betoulle, S., 2016. Functional features of hemocyte subpopulations of the invasive mollusk species *Dreissena polymorpha*. Fish Shellfish Immunol. 56, 144–154.
- Everley, P.A., Krijgsveld, J., Zetter, B.R., Gygi, S.P., 2004. Quantitative cancer proteomics: stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) as a tool for prostate cancer research. Mol. Cell. Proteomics 3, 729–735.
- Fabbri, E., Capuzzo, A., 2010. Cyclic AMP signaling in bivalve molluscs: an overview. J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol. 313, 179–200.
- Falvey, E., Fleury-Olela, F., Schibler, U., 1995. The rat hepatic leukemia factor (HLF) gene encodes two transcriptional activators with distinct circadian rhythms, tissue distributions and target preferences. EMBO J. 14, 4307–4317.
- Farcy, E., Serpentine, A., Fiévet, B., Lebel, J.M., 2007. Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture. Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 146, 540–550.
- Farley, C.A., Wolf, T.H., Elston, R.A., 1988. A long-term study of microcell disease in oysters with a description of a new genus *Mikrocytos* (g. n.) and two species, *Mikrocytos machini*. (sp. n) and *Mikrocytos roughly* (sp. n). Fish. Bull., 86: 581-592 (1988). Fish. Bull. 86, 581–592.
- Farries, T.C., Atkinson, J.P., 1991. Evolution of the complement system. Immunol. Today 12, 295–300.
- Fasulo, S., Mauceri, A., Giannetto, A., Maisano, M., Bianchi, N., Parrino, V., 2008. Expression of metallothionein mRNAs by in situ hybridization in the gills of *Mytilus galloprovincialis*, from natural polluted environments. Aquat. Toxicol. 88, 62–68.
- Fathke, C., Wilson, L., Shah, K., Kim, B., Hocking, A., Moon, R., Isik, F., 2006. Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing. BMC Cell Biol.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu. Rev. Physiol. 61, 243–82.
- Feder, M.E., Walsler, J.C., 2005. The biological limitations of transcriptomics in elucidating stress and stress responses, in: Journal of Evolutionary Biology. pp. 901–910.
- Feng, S.Y., 1988. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. Am Fish Soc Spec Pub 18, 153–168.
- Feng, Y., Walsh, C.A., 2004. The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. Nat. Cell Biol. 6, 1034–1038.
- Fernández-Boo, S., 2015. Evaluation of the intra and interspecific variability in the genus *Perkinsus*. Proteomic analysis of the parasite and its interaction with the host. Universidad de Santiago de Compostela.
- Fernández-Boo, S., Villalba, A., Cao, A., 2016. Protein expression profiling in haemocytes and plasma of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in response to infection with *Perkinsus olseni*. J. Fish Dis. 1–17.
- Fernandez-Trujillo, A., Ferro, P., Garcia-Rosado, E., Infante, C., Alonso, M.C., Bejar, J., Borrego, J.J., Manchado, M., 2008. Poly I:C induces Mx transcription and promotes an antiviral state against *Sole aquabirnavirus* in the flatfish *Senegalese sole*. Fish Shellfish Immunol. 24, 279–285.

- Fernández Robledo, J. a., Vasta, G.R., Record, N.R., 2014. Protozoan Parasites of Bivalve Molluscs: Literature Follows Culture. *PLoS One* 9, e100872.
- Fernández-puente, P., Mateos, J., Blanco, F.J., Ruiz-romero, C., 2014. LC-MALDI-TOF/TOF for Shotgun Proteomics, *Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY.
- Field, H.I., Fenyő, D., Beavis, R.C., 2002. RADARS, a bioinformatics solution that automates proteome mass spectral analysis, optimises protein identification, and archives data in a relational database, in: *Proteomics*. pp. 36–47.
- Fields, S., 2001. Proteomics. *Proteomics in genomeland*. *Science* 291, 1221–1224.
- Fields, P. A., Zuzow, M.J., Tomanek, L., 2012. Proteomic responses of blue mussel (*Mytilus*) congeners to temperature acclimation. *J. Exp. Biol.* 215, 1106–16.
- Figueras, A.J., Villalba, A., 1988. Patología de moluscos. *Patología en Acuicultura*.
- Figueras, A.J., 1991. *Bonamia* status and its effects in cultured flat oysters in the Ria de Vigo, Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture*.
- Figueras, A., Robledo, J.A.F., 1994. *Bonamia ostreae* present in flat oysters (*Ostrea edulis*) does not infect mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 98–100.
- Fisher, W.S., 1986. Immunity in Invertebrates: Structure and functions of oyster hemocytes., *Proceedings in Life Sciences*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Fisher, W.S., 1988. Environmental influence on bivalve hemocyte function. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 225–237.
- Fisher, W.S., 2004. Antimicrobial activity of copper and zinc accumulated in Eastern oyster amebocytes. *J. Shellfish Res.* 23, 321–351.
- Fitzgerald, J., Tay Ting, S., Bateman, J.F., 2002. WARP is a new member of the von Willebrand factor A-domain superfamily of extracellular matrix proteins. *FEBS Lett.* 517, 61–6.
- Fleury, E., Huvet, A., 2012. Microarray analysis highlights immune response of pacific oysters as a determinant of resistance to summer mortality. *Mar. Biotechnol. (NY)*. 14, 203–17.
- Flores-Nunes, F., Gomes, T., Company, R., Moraes, R.R.M., Sasaki, S.T., Taniguchi, S., Bicego, M.C., Melo, C.M.R., Bairy, A.C.D., Bebianno, M.J., 2015. Changes in protein expression of pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed in situ to urban sewage. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 17267–17279.
- Flye-Sainte-Marie, J., Pouvreau, S., Paillard, C., Jean, F., 2007. Impact of Brown Ring Disease on the energy budget of the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 349, 378–389.
- Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M., Jäättelä, M., 2001. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J. Cell Biol.* 153, 999–1010.
- Ford, S., Figueras, A., 1988. Effects of sublethal infection by the parasite *Haplosporidium nelsoni* (MSX) on gameto-genesis, spawning, and sex ratios of oysters in Delaware Bay, USA. *Dis. Aquat. Organ.* 4, 121–133.
- Ford, S.E., Haskin, H.H., 1988. Management strategies for MSX (*Haplosporidium nelsoni*) disease in Eastern oysters. *Am Fish Soc Spec Publ* 18, 249–256.
- Ford, S.E., Kanaley, S., Littlewood, D., 1993. Cellular Responses of Oysters Infected with *Haplosporidium nelsoni*: Changes in Circulating and Tissue-Infiltrating Hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 61, 49–57.
- Foster, B., Grewal, S., Graves, O., Hughes, F.M., Sokolova, I.M., 2011. Copper exposure affects hemocyte apoptosis and *Perkinsus marinus* infection in eastern oysters

- Crassostrea virginica* (Gmelin). Fish Shellfish Immunol. 31, 341–349.
- Fraga, A.P.M., Marques, M.R.F., Federal, U., Catarina, D.S., Federal, U., Catarina, D.S., 2015. Protein expression profiling in the gill of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) naturally infected with White Spot Syndrome Virus 88, 747–765.
- Frank-Lawale, A., Allen, S.K., Dégremont, L., 2014. Breeding and Domestication of Eastern Oyster ( *Crassostrea virginica* ) Lines for Culture in the Mid-Atlantic, Usa: Line Development and Mass Selection for Disease Resistance. J. Shellfish Res. 33, 153–165.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem. 64, 97–112.
- Friedman, C.S., McDowell, T., Groff, J.M., Hollibaugh, J.T., Manzer, D., Hedrick, R.P., 1989. Presence of *Bonamia ostreae* among populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis* Linne, in California, USA. J. Shellfish Res. 8, 133–137.
- Friedman, C.S., Beattie, J.H., Elston, R.A., Hedrick, R.P., 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.
- Friedman, C.S., Perkins, F.O., 1994. Range extension of *Bonamia ostreae* to Maine, U.S.A. J. Invertebr. Pathol.
- Friedman, A.D., Keefer, J.R., Kummalu, T., Liu, H., Wang, Q.F., Cleaves, R., 2003. Regulation of granulocyte and monocyte differentiation by CCAAT/enhancer binding protein ?? Blood Cells, Mol. Dis.
- Frova, C., 2006. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. Biomol. Eng.
- Fu, D., Zhang, Y., Yu, Z., 2011. Cloning and expression analysis of a ubiquitin gene (UbL40) in the haemocytes of *Crassostrea hongkongensis* under bacterial challenge. Chinese J. Oceanol. Limnol. 29, 80–86.
- Fu, Z., Zhang, L., Liu, X., Zhang, Y., Zhang, Q., Li, X., Zheng, W., Sun, L., Tian, J., 2013. Comparative proteomic analysis of the sun- and freeze-dried earthworm *Eisenia fetida* with differentially thrombolytic activities. J. Proteomics 83, 1–14.
- Fuentes, J., López, J.L., Mosquera, E., Vázquez, J., Villalba, A., Álvarez, G., 2002. Growth, mortality, pathological conditions and protein expression of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* crosses cultured in the Ría de Arousa (NW of Spain). Aquaculture 213, 233–251.
- Fujimoto, T., Doi, K., Koyanagi, M., Tsunoda, T., Takashima, Y., Yoshida, Y., Sasazuki, T., Shirasawa, S., 2009. ZFAT is an antiapoptotic molecule and critical for cell survival in MOLT-4 cells. FEBS Lett. 583, 568–572.
- Fujita, T., Matsushita, M., Endo, Y., 2004. The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. Immunol. Rev. 198, 185–202.
- Gaffen, S.L., 2011. Recent advances in the IL-17 cytokine family. Curr. Opin. Immunol.
- Gaffney, P.M., Bushek, D., 1996. Genetic aspects of disease resistance in oysters. J. Shellfish Res. 15, 135–140.
- Gagné, N., Cochenec, N., Stephenson, M., McGladdery, S., Meyer, G.R., Bower, S.M., 2008. First report of a Mikrocytos-like parasite in European oysters *Ostrea edulis* from Canada after transport and quarantine in France. Dis. Aquat. Organ. 80, 27–35.
- Gangwani, L., Mikrut, M., Galcheva-Gargova, Z., Davis, R.J., 1998. Interaction of ZPR1 with Translation Elongation Factor-1 $\alpha$  in Proliferating Cells. J. Cell Biol. 143, 1471–1484.
- Gao, Q., Song, L., Ni, D., Wu, L., Zhang, H., Chang, Y., 2007. cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 147, 704–715.



- García-García, E., Prado-Álvarez, M., Novoa, B., Figueras, A., Rosales, C., 2008. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 637–653.
- García, C.C., Damonte, E.B., 2007. Zn finger containing proteins as targets for the control of viral infections. *Infect. Disord. Drug Targets* 7, 204–212.
- Garnier, C., Barbier, P., Gilli, R., Lopez, C., Peyrot, V., Briand, C., 1998. Heat-shock protein 90 (hsp90) binds in vitro to tubulin dimer and inhibits microtubule formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 414–9.
- Gauthier, J.D., Vasta, G.R., 1994. Inhibition of in vitro replication of the oyster parasite *Perkinsus marinus* by the natural iron chelators transferrin, lactoferrin, and desferrioxamine. *Dev. Comp. Immunol.* 18, 277–286.
- Gauthier, J.D., Feig, B., Vasta, G.R., 1995. Effect of Fatal Bovine Serum Glycoproteins on the In Vitro Proliferation of the Oyster Parasite *Perkinsus marinus*. Development of a Chemically Defined Culture Medium, *Aquaculture* 95 u Book of Abstracts.
- Gerdol, M., Manfrin, C., De Moro, G., Figueras, A., Novoa, B., Venier, P., Pallavicini, A., 2011. The C1q domain containing proteins of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: A widespread and diverse family of immune-related molecules. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 635–643.
- Gerdol, M., De Moro, G., Manfrin, C., Venier, P., Pallavicini, A., 2012. Big defensins and mytimacins, new AMP families of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 390–9.
- Gerdol, M., Venier, P., 2015. An updated molecular basis for mussel immunity. *Fish Shellfish Immunol.*
- Gerdol, M., Venier, P., Pallavicini, A., 2015. The genome of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* brings new insights on the massive expansion of the C1q gene family in Bivalvia. *Dev. Comp. Immunol.* 49, 59–71.
- Gerlai, R., 2002. Phenomics: Fiction or the future? *Trends Neurosci.*
- Gervais, O., Chollet, B., Renault, T., Arzul, I., 2016. Flat oyster follows the apoptosis pathway to defend against the protozoan parasite *Bonamia ostreae*. *Fish Shellfish Immunol.* 56, 322–329.
- Gestal, C., Costa, M., Figueras, A., Novoa, B., 2007. Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: Identification of new antimicrobial peptides. *Gene* 406, 134–143.
- Gestal, C., Roch, P., Renault, T., Pallavicini, A., Paillard, C., Novoa, B., Oubella, R., Venier, P., Figueras, A., 2008. Study of Diseases and the Immune System of Bivalves Using Molecular Biology and Genomics. *Rev. Fish. Sci.* 16, 133–156.
- Gestal, C., Pallavicini, A., Venier, P., Novoa, B., Figueras, A., 2010. MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 926–934.
- Gestal, C., Castellanos-Martínez, S., 2015. Understanding the cephalopod immune system based on functional and molecular evidence. *Fish Shellfish Immunol.* 1–11.
- Ghosh, S., May, M.J., Kopp, E.B., 1998. NF- $\kappa$ B AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunology* 16, 225–260.
- Gibbons, I.R., 1996. The role of dynein in microtubule-based motility. *Cell Struct. Funct.* 21, 331–342.
- Giese, A.C., 1959. Comparative physiology: annual reproductive cycles of marine invertebrates. *Annu. Rev. Physiol.* 21, 547–576.
- Gilgès, D., Vinit, M. a, Callebaut, I., Coulombel, L., Cacheux, V., Romeo, P.H., Vigon, I.,

2000. Polydom: a secreted protein with pentraxin, complement control protein, epidermal growth factor and von Willebrand factor A domains. *Biochem. J.* 352 Pt 1, 49–59.
- Glinski, Z., Jarosz, J., 1997. Molluscan immune defenses. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 45, 149–155.
- Glish, G.L., Vachet, R.W., 2003. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 140–150.
- Go, Y.M., Jones, D.P., 2008. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*
- Godovac-Zimmermann, J., Brown, L.R., 2001. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* 20, 1–57.
- Goedken, M., Morsey, B., Sunila, I., Dungan, C., De Guise, S., 2005. The effects of temperature and salinity on apoptosis of *Crassostrea virginica* hemocytes and *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* 24, 177–183.
- Goetz, R., Mohammadi, M., 2013. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D.H., Niall, H.D., Boyse, E.A., 1975. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 11–15.
- Golovanov, A.P., Chuang, T.H., DerMardirossian, C., Barsukov, I., Hawkins, D., Badii, R., Bokoch, G.M., Lian, L.Y., Roberts, G.C., 2001. Structure-activity relationships in flexible protein domains: regulation of rho GTPases by RhoGDI and D4 GDI. *J. Mol. Biol.* 305, 121–135.
- Gomes, T., Chora, S., Pereira, C.G., Cardoso, C., Bebianno, M.J., 2014. Proteomic response of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to CuO NPs and Cu<sup>2+</sup>: An exploratory biomarker discovery. *Aquat. Toxicol.* 155, 327–336.
- Gómez-Chiarri, M., Guo, X., Tanguy, A., He, Y., Proestou, D., 2015. The use of -omic tools in the study of disease processes in marine bivalve mollusks.
- Gómez-Mendikute, A., Cajaraville, M.P., 2003. Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo[a]pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol. Vitr.* 17, 539–546.
- Gonzalez, M., Romestand, B., Fievet, J., Huvet, A., Lebart, M.-C., Gueguen, Y., Bachère, E., 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1089–97.
- Gonzalez, M., Gueguen, Y., Desserre, G., de Lorgeril, J., Romestand, B., Bachère, E., 2007a. Molecular characterization of two isoforms of defensin from hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 332–339.
- Gonzalez, M., Gueguen, Y., Destoumieux-Garzon, D., Romestand, B., Fievet, J., Pugnière, M., Roquet, F., Escoubas, J.-M., Vandenbulcke, F., Levy, O., Sauné, L., Bulet, P., Bachère, E., 2007b. Evidence of a bactericidal permeability increasing protein in an invertebrate, the *Crassostrea gigas* Cg-BPI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 17759–17764.
- Goodall, C.P., Bender, R.C., Broderick, E.J., Bayne, C.J., 2004. Constitutive differences in Cu/Zn superoxide dismutase mRNA levels and activity in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) that are either susceptible or resistant to *Schistosoma mansoni* (Trematoda). *Mol. Biochem. Parasitol.* 137, 321–8.
- Goode, B.L., Eck, M.J., 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 593–627.



- Gorbushin, A.M., Iakovleva, N. V., 2011. A new gene family of single fibrinogen domain lectins in *Mytilus*. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 434–438.
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Weiss, W., 1999. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures, in: *Electrophoresis*. pp. 712–717.
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037–1053.
- Görg, A., Weiss, W., Dunn, M.J., 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*.
- Gorman, M.J., Andreeva, O. V., Paskewitz, S.M., 2000. Sp22D: A multidomain serine protease with a putative role in insect immunity. *Gene* 251, 9–17.
- Gosling, E., 2003. *Bivalve Molluscs*. Fishing News Books.
- Gotthardt, M., Trommsdorff, M., Nevitt, M.F., Shelton, J., Richardson, J.A., Stockinger, W., Nimpf, J., Herz, J., 2000. Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *J. Biol. Chem.*
- Götze, S., Matoo, O.B., Beniash, E., Saborowski, R., Sokolova, I.M., 2014. Interactive effects of CO<sub>2</sub> and trace metals on the proteasome activity and cellular stress response of marine bivalves *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Aquat. Toxicol.* 149, 65–82.
- Gourdon, I., Gricourt, L., Kellner, K., Roch, P., Escoubas, J.M., 2000. Characterization of a cDNA encoding a 72 kDa heat shock cognate protein (Hsc72) from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *DNA Seq.* 11, 265–270.
- Grabowski, J.H., Peterson, C.H., 2007. Restoring oyster reefs to recover ecosystem services. *Ecosyst. Eng. concepts, theory Appl.* 281–298.
- Green, J.L., Kuntz, S.G., Sternberg, P.W., 2008. Ror receptor tyrosine kinases: orphans no more. *Trends Cell Biol.* 18, 536–544.
- Green, T.J., Barnes, A.C., 2009. Inhibitor of REL/NF-Kappa B is regulated in Sydney rock oysters in response to specific double-stranded RNA and *Vibrio alginolyticus*, but the major immune anti-oxidants EcSOD and Prx6 are non-inducible. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 260–265.
- Green, T.J., Dixon, T.J., Devic, E., Adlard, R.D., Barnes, A.C., 2009. Differential expression of genes encoding anti-oxidant enzymes in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* (Gould) selected for disease resistance. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 799–810.
- Green, T.J., Montagnani, C., 2013. Poly I:C induces a protective antiviral immune response in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against subsequent challenge with Ostreid herpesvirus (OsHV-1  $\tau$  var). *Fish Shellfish Immunol.* 35, 382–388.
- Green, T.J., Benkendorff, K., Robinson, N., Raftos, D., Speck, P., 2014a. Anti-viral gene induction is absent upon secondary challenge with double-stranded RNA in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 39, 492–497.
- Green, T.J., Montagnani, C., Benkendorff, K., Robinson, N., Speck, P., 2014b. Ontogeny and water temperature influences the antiviral response of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 36, 151–7.
- Green, T.J., Raftos, D., Speck, P., Montagnani, C., 2015a. Antiviral immunity in marine molluscs. *J. Gen. Virol.* 96, 2471–2482.
- Green, T.J., Rolland, J.L., Vergnes, A., Raftos, D., Montagnani, C., 2015b. OsHV-1 countermeasures to the Pacific oyster's anti-viral response. *Fish Shellfish Immunol.* 47,

- 435–443.
- Green, T.J., Chataway, T., Melwani, A.R., Raftos, D.A., 2016a. Proteomic analysis of hemolymph from poly(I:C)-stimulated *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 48, 39–42.
- Green, T.J., Helbig, K., Speck, P., Raftos, D.A., 2016b. Primed for success: Oyster parents treated with poly(I:C) produce offspring with enhanced protection against Ostreid herpesvirus type I infection. *Mol. Immunol.* 78, 113–120.
- Greenway, S.C., Storey, K.B., 1999. The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 242, 259–272.
- Green, T.J., Speck, P., 2018. Antiviral defense and innate immune memory in the oyster. *Viruses* 10, 1–11.
- Gris, C.F., Baldoni, A., 2013. Proteomics and Its Use in Obtaining Superior Soybean Genotypes. *A Compr. Surv. Int. Soybean Res. Physiol. Agron. Nitrogen Relationships.*
- Grizel, H., Comps, M., Bonami, J.R., Cousserans, F., Duthoit, J.L., Penneç, Ma., 1974. Recherche sur l'agent de la maladie de la glande digestive de *Ostrea edulis* Linne. *Sci. Pêche* 240, 7–30.
- Grizel, H., Tige, G., 1982. Evolution of the hemocytic disease caused by *Bonamia ostreae*. 3rd Int Coll. Invert. Pathol 3rd Int Co, 258–260.
- Grizel, H., Bachere, E., Mialhe, E., Tige, G., 1986. Solving parasite-related problems in cultured molluscs. *Int. J. Parasitol.* 17, 301–308.
- Grizel, H., Mialhe, E., Chagot, D., Boulo, V., Bachere, E., 1988. Bonamiasis: a model study of diseases in marine molluscs. *Am. Fish. Soc. Spec. Publ.* 18, 1–4.
- Grizzle, R.E., Greene, J.K., Luckenbach, M.W., Coen, L.D., 2006. A new in situ method for measuring seston uptake by suspension-feeding bivalve molluscs. *J. Shellfish Res.*
- Grossmann, J., Fischer, B., Baerenfaller, K., Owiti, J., Buhmann, J.M., Gruissem, W., Baginsky, S., 2007. A workflow to increase the detection rate of proteins from unsequenced organisms in high-throughput proteomics experiments. *Proteomics.*
- Gruenberg, J., van der Goot, F.G., 2006. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 495–504.
- Gruenheid, S., Finlay, B.B., 2003. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature* 422, 775–781.
- Gueguen, Y., Herpin, A., Garnier, J., Fievet, J., Escoubas, J., Bulet, P., Gonzalez, M., Lelong, C., Favrel, P., Bache, E., 2006. Characterization of a Defensin from the Oyster *Crassostrea gigas*. *J. Biol. Chem.* 281, 313–323.
- Guillou, F., Mitta, G., Galinier, R., Coustau, C., 2007. Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 657–671.
- Günther, R.T., 1897. The Oyster Culture of the Ancient Romans. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 4, 360.
- Guo, X., He, Y., Zhang, L., Lelong, C., Jouaux, A., 2015. Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. *Fish Shellfish Immunol.*
- Guo, X., Ford, S.E., 2016. Infectious diseases of marine molluscs and host responses as revealed by genomic tools. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371, 20150206.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R., 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1720–1730.
- Gygi, S.P., Corthals, G.L., Zhang, Y., Rochon, Y., Aebersold, R., 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- Hackam, A.S., Yassa, A.S., Singaraja, R., Metzler, M., Gutekunst, C.A., Gan, L., Warby, S., Wellington, C.L., Vaillancourt, J., Chen, N., Gervais, F.G., Raymond, L., Nicholson, D.W., Hayden, M.R., 2000. Huntingtin interacting protein 1 induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effector domain. *J. Biol. Chem.* 275, 41299–41308.
- Haddon, W.F., McLafferty, F.W., 1968. Metastable ion characteristics. VII. Collision-induced metastables. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 4745–4746.
- Hahn, J.S., 2009. The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development. *BMB Rep.* 42, 623–30.
- Hall, A., 1994. Small GTP-Binding Proteins and the Regulation of the Actin Cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 31–54.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical* 219, 1–14.
- Hamano, K., Awaji, M., 2004. Novel member of the PAR domain bZIP gene family isolated from Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *DNA Seq.* 15, 174–179.
- Hammarström, S., 1999. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin. Cancer Biol.* 9, 67–81.
- Hanington, P.C., Zhang, S.-M., 2011. The primary role of fibrinogen-related proteins in invertebrates is defense, not coagulation. *J. Innate Immun.* 3, 17–27.
- Hannon, G.J., 2002. RNA interference. *Nature* 418, 244–251.
- Hanquet, A.C., Jouaux, A., Heude, C., Mathieu, M., Kellner, K., 2011. A sodium glucose co-transporter (SGLT) for glucose transport into *Crassostrea gigas* vesicular cells: Impact of alimentation on its expression. *Aquaculture* 313, 123–128.
- Harrang, E., Heurtebise, S., Faury, N., Robert, M., Arzul, I., Lapègue, S., 2015. Can survival of European flat oysters following experimental infection with *Bonamia ostreae* be predicted using QTLs? *Aquaculture* 448, 521–530.
- Harris-Young, L., Tamplin, M.L., Mason, J.W., Aldrich, H.C., Jackson, J.K., 1995. Viability of *Vibrio vulnificus* in association with hemocytes of the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 52–57.
- Harrison, R.E., Grinstein, S., 2002. Phagocytosis and the microtubule cytoskeleton. *Biochem. Cell Biol.* 80, 509–515.
- Hartwig, A., 2001. Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxid. Redox Signal.* 3, 625–634.
- Harvell, C.D., Kim, K., Burkholder, J.M., Colwell, R.R., Epstein, P.R., Grimes, D.J., Hofmann, E.E., Lipp, E.K., Osterhaus, A.D., Overstreet, R.M., Porter, J.W., Smith, G.W., Vasta, G.R., 1999. Emerging marine diseases--climate links and anthropogenic factors. *Science* 285, 1505–1510.
- Hasanuzzaman, A.F.M., Rubiolo, J.A., Robledo, D., Gómez-Tato, A., Álvarez-Dios, J.A., Fernández-Boo, S., Cao, A., Villalba, A., Pardo, B.G., Martínez, P., 2018. Gene expression analysis of *Ruditapes philippinarum* haemocytes after experimental *Perkinsus olseni* zoospore challenge and infection in the wild. *Fish Shellfish Immunol.* 72, 611–621.
- Haug, T., Stensvåg, K., Olsen, Ø.M., Sandsdalen, E., Styrvold, O.B., 2004. Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus*. *J. Invertebr. Pathol.* 85, 112–119.
- Hayden, M.S., West, a P., Ghosh, S., 2006. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758–6780.
- Hayes, J.D., Pulford, D.J., 1995. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug

- resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 445–600.
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88.
- He, X., Zhang, Y., Yu, F., Yu, Z., 2011. A novel sialic acid binding lectin with anti-bacterial activity from the Hong Kong oyster (*Crassostrea hongkongensis*). *Fish Shellfish Immunol.* 31, 1247–1250.
- He, Y., Jouaux, A., Ford, S.E., Lelong, C., Sourdain, P., Mathieu, M., Guo, X., 2015. Transcriptome analysis reveals strong and complex antiviral response in a mollusc. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 131–144.
- Hederstedt, L., 2003. Structural biology. Complex II is complex too. *Science* 299, 671–2.
- Hégaret, H., Wikfors, G.H., Soudant, P., 2003. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: Aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 293, 249–265.
- Hegde, A.N., 2004. Ubiquitin-proteasome-mediated local protein degradation and synaptic plasticity. *Prog. Neurobiol.*
- Hehlans, T., Pfeffer, K., 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1–20.
- Hellio, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2007. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) in vitro. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 433–440.
- Henikoff, S., Henikoff, J.G., 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10915–10919.
- Hernandez, P., Müller, M., Appel, R.D., 2006. Automated protein identification by tandem mass spectrometry: issues and strategies. *Mass Spectrom. Rev.* 25, 235–54.
- Hernández, P., Binz, P.A., Wilkins, M.R., 2007. Protein identification in proteomics., in: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. (Ed.), *Proteome Research: Concepts, Technology and Application*.
- Herpin, A., Lelong, C., Becker, T., Rosa, F.M., Favrel, P., Cunningham, C., 2005. Structural and functional evidences for a type 1 TGF- $\beta$  sensu stricto receptor in the lophotrochozoan *Crassostrea gigas* suggest conserved molecular mechanisms controlling mesodermal patterning across bilateria. *Mech. Dev.* 122, 695–705.
- Hershko, A., Ciechanover, A., 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425–479.
- Hervio, D., Bachere, E., Mialhe, E., Grizel, H., 1989. Chemiluminescent responses of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* hemocytes to *Bonamia ostreae* (Asctospora). *Dev. Comp. Immunol.* 13, 449. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(89\)90176-6](https://doi.org/10.1016/0145-305X(89)90176-6)
- Hervio, D., Chagot, D., Godin, P., Grizel, H., Mialhe, E., 1991. Localization and characterization of acid phosphatase activity in *Bonamia ostreae* (Asctospora), an intrafemocytic protozoan parasite of the flat oyster *Ostrea edulis* (Bivalvia). *Dis. Aquat. Organ.* 12, 67–70.
- Heussler, V.T., Küenzi, P., Rottenberg, S., 2001. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int. J. Parasitol.* 31, 1166–1176.
- Hicke, L., 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 195–201.
- Hicks, S.J., Theodoropoulos, G., Carrington, S.D., Corfield, P., 2000. The role of mucins in host-parasite interactions. Part I-protozoan parasites. *Parasitol. Today* 16, 476–481.
- Hiemstra, P.S., 2002. Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation.

- Biochem. Soc. Trans. 30, 116–120.
- Higgs, H.N., 2005. Formin proteins: A domain-based approach. Trends Biochem. Sci.
- Hightower, L.E., Hendershot, L.M., 1997. Molecular chaperones and the heat shock response at Cold Spring Harbor. Cell Stress Chaperones 2, 1–11.
- Hill, K.M., Carnegie, R.B., Aloui-Bejaoui, N., Gharsalli, R. El, White, D.M., Stokes, N. a, Burreson, E.M., 2010. Observation of a *Bonamia* sp. infecting the oyster *Ostrea stentina* in Tunisia, and a consideration of its phylogenetic affinities. J. Invertebr. Pathol. 103, 179–85.
- Hine, P.M., 1992. Ultrastructural and ultracytochemical observations on *Bonamia* sp. in oysters (*Tiostrea chilensis*), with a consideration of organelle function. Aquaculture 107, 175–183.
- Hine, P.M., Wesney, B., 1994a. Interaction of phagocytosed *Bonamia* sp. (Haplosporidia) with haemocytes of oysters *Tiostrea chilensis*. Dis. Aquat. Organ. 20, 219–229.
- Hine, P.M., Wesney, B., 1994b. The functional cytology of *Bonamia* sp. (Haplosporidia) infecting oysters *Tiostrea chilensis*: An ultracytochemical study. Dis. Aquat. Organ. 20, 207–217.
- Hine, P.M., Thorne, T., 1997. Replication of herpes-like viruses in haemocytes of adult flat oysters *Ostrea angasi*: An ultrastructural study. Dis. Aquat. Org. 29, 189–196.
- Hine, P., 1999. The inter-relationships of bivalve haemocytes. Fish Shellfish Immunol. 9, 367–385.
- Hine, P.M., Cochenne-Laureau, N., Berthe, F.C., 2001. *Bonamia exitiosus* n. sp. (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. Dis. Aquat. Organ. 47, 63–72.
- Hine, P.M., 2002. Severe apicomplexan infection in the oyster *Ostrea chilensis*: a possible predisposing factor in bonamiosis. Dis. Aquat. Organ. 51, 49–60.
- Hine, P.M., Diggle, B.K., Parsons, M.J.D., Pringle, A., Bull, B., 2002. The effects of stressors on the dynamics of *Bonamia exitiosus* Hine, Cochenne-Laureau & Berthe, infections in flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi). J. Fish Dis. 25, 545–554.
- Hinzmann, M., Lopes-Lima, M., Cerca, F., Correia, A., Machado, J., Vilanova, M., 2017. Identification of distinct haemocyte populations from the freshwater bivalves swan mussel (*Anodonta cygnea*) and duck mussel (*Anodonta anatina*) using wheat-germ agglutinin. Can. J. Zool. 95.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Okada, Y., 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. Curr. Opin. Cell Biol.
- Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Romeo, M., Girard, J.-P., 2002. Purification and partial characterization of seven glutathione S-transferase isoforms from the clam *Ruditapes decussatus*. Eur. J. Biochem. 269, 4359–4366.
- Hoehne, M., Gert de Couet, H., Stuermer, C.A.O., Fischbach, K.-F., 2005. Loss- and gain-of-function analysis of the lipid raft proteins Reggie/Flotillin in *Drosophila*: They are posttranslationally regulated, and misexpression interferes with wing and eye development. Mol. Cell. Neurosci. 30, 326–338.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C. a, Ezekowitz, R. a, 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science 284, 1313–1318.
- Hoffmann, J.A., Reichhart, J.-M., 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. Nat. Immunol. 3, 121–126.
- Holzbaun, E.L., Vallee, R.B., 1994. DYNEINS: molecular structure and cellular function. Annu. Rev. Cell Biol. 10, 339–372.
- Hong, Y., Peng, J., Jiang, W., Fu, Z., Liu, J., Shi, Y., Li, X., Lin, J., 2011. Proteomic analysis of schistosoma *Japonicum schistosomulum* proteins that are differentially expressed



- among hosts differing in their susceptibility to the infection. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M110.006098.
- Hong, H.-K., Kang, H.-S., Le, T.C., Choi, K.-S., 2013. Comparative study on the hemocytes of subtropical oysters *Saccostrea kegaki* (Torigoe & Inaba, 1981), *Ostrea circumpecta* (Pilsbry, 1904), and *Hytotissa hyotis* (Linnaeus, 1758) in Jeju Island, Korea: morphology and functional aspects. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 2020–5.
- Hong, H.-K., Donaghy, L., Choi, K.-S., 2014. Flow cytometric studies on the morphology and immunological functions of hemocytes in the Iwagaki oyster *Crassostrea nippona*. *Fish. Sci.* 80, 969–976.
- Hu, R.J., Moorthy, S., Bennett, V., 1995. Expression of functional domains of beta G-spectrin disrupts epithelial morphology in cultured cells. *J. Cell Biol.* 128, 1069–1080.
- Huan, P., Zhang, X., Li, F., Zhang, Y., Zhao, C., Xiang, J., 2010. Chromosomal localization and molecular marker development of the lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein gene in the Zhikong scallop *Chlamys farreri* (Jones et Preston) (Pectinoida, Pectinidae). *Genet. Mol. Biol.* 33, 36–43.
- Huan, P., Wang, H., Liu, B., 2011. Comparative proteomic analysis of challenged Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): A new insight into the anti-Vibrio immune response of marine bivalves. *Fish Shellfish Immunol.*
- Huan, P., Wang, H., Dong, B., Liu, B., 2012. Identification of differentially expressed proteins involved in the early larval development of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Proteomics* 75, 3855–3865.
- Huang, S., Yuan, S., Guo, L., Yu, Y., Li, J., Wu, T., Liu, T., Yang, M., Wu, K., Liu, H., Ge, J., Yu, Y., Huang, H., Dong, M., Yu, C., Chen, S., Xu, A., 2008. Genomic analysis of the immune gene repertoire of amphioxus reveals extraordinary innate complexity and diversity. *Genome Res.* 18, 1112–1126.
- Huang, X.-D., Liu, W.-G., Guan, Y.-Y., Shi, Y., Wang, Q., Zhao, M., Wu, S.-Z., He, M.-X., 2012. Molecular cloning, characterization and expression analysis of tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 (TRAF3) from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 652–658.
- Huang, X. D, Zhao, M., Liu, W.G., Guan, Y.Y., Shi, Y., Wang, Q., Wu, S.Z., He, M.X., 2013. Gigabase-Scale Transcriptome Analysis on Four Species of Pearl Oysters. *Mar. Biotechnol.* 15, 253–264.
- Huang, X.-D., Liu, W.-G., Wang, Q., Zhao, M., Wu, S.-Z., Guan, Y.-Y., Shi, Y., He, M.-X., 2013. Molecular characterization of interferon regulatory factor 2 (IRF-2) homolog in pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1279–1286.
- Huang, B., Zhang, L., Du, Y., Li, L., Qu, T., Meng, J., Zhang, G., 2014. Alternative splicing and immune response of *Crassostrea gigas* tumor necrosis factor receptor-associated factor 3. *Mol. Biol. Rep.* 41, 6481–6491.
- Huang, G., Huang, S., Yan, X., Yang, P., Li, J., Xu, W., Zhang, L., Wang, R., Yu, Y., Yuan, S., Chen, S., Luo, G., Xu, A., 2014. Two apextrin-like proteins mediate extracellular and intracellular bacterial recognition in amphioxus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 13469–74.
- Hudson, P.J., Rizzoli, A.P., Grenfell, B.T., Heesterbeek, J.A.P., Dobson, A.P., 2002. Ecology of wildlife diseases, in: *Ecology of Wildlife Diseases*. pp. 1–5.
- Huffman, J.E., Tripp, M.R., 1982. Cell types and hydrolytic enzymes of soft shell clam (*Mya arenaria*) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*
- Hughes, T.K., Smith, E.M., Chin, R., Cadet, P., Sinisterra, J., Leung, M.K., Shipp, M.A., Scharrer, B., Stefano, G.B., 1990. Interaction of immunoreactive monokines (interleukin 1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U. S. A. 87, 4426–4429.
- Hughes, T.K., Smith, E.M., Barnett, J.A., Charles, R., Stefano, G.B., 1991a. LPS stimulated invertebrate hemocytes: A role for immunoreactive TNF and IL-1. *Dev. Comp. Immunol.* 15, 117–122.
- Hughes Jr., T.K., Smith, E.M., Barnett, J.A., Charles, R., Stefano, G.B., 1991b. Lipopolysaccharide and opioids activate distinct populations of *Mytilus edulis* immunocytes. *Cell Tissue Res* 264, 317–320.
- Hughes, T.K., Smith, E.M., Leung, M.K., Stefano, G.B., 1992. Immunoreactive cytokines in *Mytilus edulis* nervous and immune interactions. *Acta Biol. Hung.* 43, 269–273.
- Hughes, F.M., Foster, B., Grewal, S., Sokolova, I.M., 2010. Apoptosis as a host defense mechanism in *Crassostrea virginica* and its modulation by *Perkinsus marinus*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 247–257.
- Hui, J.H.L., Tobe, S.S., Chan, S.-M., 2008. Characterization of the putative farnesoic acid O-methyltransferase (LvFAMeT) cDNA from white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Evidence for its role in molting. *Peptides* 29, 252–60.
- Husmann, G., Abele, D., Rosenstiel, P., Clark, M.S., Kraemer, L., Philipp, E.E.R., 2014. Age-dependent expression of stress and antimicrobial genes in the hemocytes and siphon tissue of the Antarctic bivalve, *Laternula elliptica*, exposed to injury and starvation. *Cell Stress Chaperones* 19, 15–32.
- Huxham, M., Raffaelli, D., Pike, A., 1995. Parasites and food web patterns. *J. Anim. Ecol.* 168–176.
- Iglesias, J., Trigueros, M., Rojas-triana, M., Fernández, M., Albar, J.P., Bustos, R., Paz-ares, J., Rubio, V., 2013. Proteomics identifies ubiquitin – proteasome targets and new roles for chromatin-remodeling in the Arabidopsis response to phosphate starvation. *J. Proteomics* 94, 1–22.
- Inukai, T., Inoue, A., Kurosawa, H., Goi, K., Shinjyo, T., Ozawa, K., Mao, M., Inaba, T., Look, A.T., 1999. SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Mol. Cell* 4, 343–352.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Beckman, J.S., 1992. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 446–451.
- Ishikawa, K., Azuma, S., Ikawa, S., Semba, K., Inoue, J.I., 2005. Identification of DRG family regulatory proteins (DFRPs): Specific regulation of DRG1 and DRG2. *Genes to Cells* 10, 139–150.
- Itoh, N., Takahashi, K.G., 2007. cDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 148, 160–166.
- Itoh, N., Takahashi, K.G., 2009. A novel peptidoglycan recognition protein containing a goose-type lysozyme domain from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mol. Immunol.* 46, 1768–1774.
- Itoh, N., Kamitaka, R., Takahashi, K.G., Osada, M., 2010. Identification and characterization of multiple beta-glucan binding proteins in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Dev Comp Immunol* 34, 445–454.
- Itoh, N., Xue, Q.-G., Schey, K.L., Li, Y., Cooper, R.K., La Peyre, J.F., 2011. Characterization of the major plasma protein of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a proposed role in host defense. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 158, 9–22.
- Ivanina, A. V., Cherkasov, A.S., Sokolova, I.M., 2008. Effects of cadmium on cellular protein and glutathione synthesis and expression of stress proteins in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *J. Exp. Biol.* 211, 577–586.



- Ivanina, A. V., Taylor, C., Sokolova, I.M., 2009. Effects of elevated temperature and cadmium exposure on stress protein response in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Aquat. Toxicol.* 91, 245–254.
- Ivanina, A. V., Sokolov, E.P., Sokolova, I.M., 2010. Effects of cadmium on anaerobic energy metabolism and mRNA expression during air exposure and recovery of an intertidal mollusk *Crassostrea virginica*. *Aquat. Toxicol.* 99, 330–42.
- Iwanaga, S., Kawabata, S., Muta, T., 1998. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph their structures and functions. *J. Biochem.* 123, 1–15.
- Jacklet, J.W., 1997. Nitric oxide signaling in invertebrates. *Invert. Neurosci.* 3, 1–14.
- Jackson, J.B., Kirby, M.X., Berger, W.H., Bjorndal, K.A., Botsford, L.W., Bourque, B.J., Bradbury, R.H., Cooke, R., Erlandson, J., Estes, J.A., Hughes, T.P., Kidwell, S., Lange, C.B., Lenihan, H.S., Pandolfi, J.M., Peterson, C.H., Steneck, R.S., Tegner, M.J., Warner, R.R., 2001. Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science* 293, 629–637.
- Jain, S.K., Lim, G., 2001. Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 232–7.
- James, S.L., 1995. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol. Rev.* 59, 533–547.
- Janeway, C. a, Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216.
- Jaya, N., Garcia, V., Vierling, E., 2009. Substrate binding site flexibility of the small heat shock protein molecular chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15604–15609.
- Jayaraj, S.S., Thiagarajan, R., Arumugam, M., Mullainadhan, P., 2008. Isolation, purification and characterization of beta-1,3-glucan binding protein from the plasma of marine mussel *Perna viridis*. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 715–725.
- Jemaà, M., Morin, N., Cavelier, P., Cau, J., Strub, J.-M., Delsert, C., 2014. Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oyster. *J. Exp. Biol.*
- Jenny, M.J., Ringwood, A.H., Lacy, E.R., Lewitus, A.J., Kempton, J.W., Gross, P.S., Warr, G.W., Chapman, R.W., 2002. Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biotechnol.* (NY). 4, 81–93. <https://doi.org/10.1007/s10126-001-0072-8>
- Jenny, M.J., Ringwood, A.H., Schey, K., Warr, G.W., Chapman, R.W., 2004. Diversity of metallothioneins in the American oyster, *Crassostrea virginica*, revealed by transcriptomic and proteomic approaches. *Eur. J. Biochem.* 271, 1702–1712.
- Jensen, O.N., 2004. Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*
- Jeyaraju, D. V, Cisbani, G., De Brito, O.M., Koonin, E. V, Pellegrini, L., 2009. Hax1 lacks BH modules and is peripherally associated to heavy membranes: implications for Omi/HtrA2 and PARL activity in the regulation of mitochondrial stress and apoptosis. *Cell Death Differ.* 16, 1622–1629.
- Ji, C., Wu, H., Wei, L., Zhao, J., Wang, Q., Lu, H., 2013. Responses of *Mytilus galloprovincialis* to bacterial challenges by metabolomics and proteomics. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 489–498.
- Jiang, L., Bao, Y., Luo, C., Hu, G., Huang, C., Ding, X., Sun, K., Lu, Y., 2010. Knockdown of ubiquitin-conjugating enzyme E2C/UbcH10 expression by RNA interference inhibits glioma cell proliferation and enhances cell apoptosis in vitro. *J. Cancer Res.*

- Clin. Oncol. 136, 211–7.
- Jiang, Q., Zhou, Z., Wang, L., Yang, C., Wang, J., Wu, T., Song, L., 2015. Mutual modulation between norepinephrine and nitric oxide in haemocytes during the mollusc immune response. *Sci. Rep.* 4, 6963.
- Jiang, Q., Liu, Z., Zhou, Z., Wang, L., Wang, L., Yue, F., Wang, J., Wang, H., Song, L., 2016. Transcriptional activation and translocation of ancient NOS during immune response. *FASEB J.* 30, 3527–3540.
- Jing, X., Wenbin, Z., 2005. Characterisation of monoclonal antibodies to haemocyte types of scallop (*Chlamys farreri*). *Fish Shellfish Immunol.* 19, 17–25.
- Jing, X., Espinosa, E.P., Perrigault, M., Allam, B., 2011. Identification, molecular characterization and expression analysis of a mucosal C-type lectin in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 851–858.
- Jo, P.G., Choi, Y.K., Choi, C.Y., 2008. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 147, 460–469.
- Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K., 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191, 45–52.
- John, R.A., 1995. Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1248, 81–96.
- Jones, C.G., Lawton, J.H., Shachak, M., 1994. Organisms as Ecosystem Engineers. *Oikos* 69, 373–386.
- Jorge, I., Navarro, R.M., Lenz, C., Ariza, D., Porras, C., Jorrín, J., 2005. The holm oak leaf proteome: analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification tandem mass spectrometry de novo sequencing and sequence similarity searching. *Proteomics* 5, 222–34.
- Jouaux, A., Lafont, M., Blin, J.-L., Houssin, M., Mathieu, M., Lelong, C., 2013. Physiological change under OsHV-1 contamination in Pacific oyster *Crassostrea gigas* through massive mortality events on fields. *BMC Genomics* 14, 590.
- Kabsch, W., Vandekerckhove, J., 1992. Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21, 49–76.
- Kaji, H., Tsuji, T., Mawuenyega, K.G., Wakamiya, A., Taoka, M., Isobe, T., 2000. Profiling of *Caenorhabditis elegans* proteins using two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21, 1755–1765.
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K.J.A., Dennery, P.A., Forman, H.J., Grisham, M.B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts, L.J., Ischiropoulos, H., 2012. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1–6.
- Kamata, H., Manabe, T., Oka, S., Kamata, K., Hirata, H., 2002. Hydrogen peroxide activates I $\kappa$ B kinases through phosphorylation of serine residues in the activation loops. *FEBS Lett.* 519, 231–237.
- Kamura, T., Sato, S., Haque, D., Liu, L., Kaelin, W.G., Conaway, R.C., Conaway, J.W., 1998. The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev.* 12, 3872–3881.
- Kang, Y.S., Kim, Y.M., Park, K.I., Kim Cho, S., Choi, K.S., Cho, M., 2006. Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 1119–1131.

- Kapitulnik, J., Maines, M.D., 2009. Pleiotropic functions of biliverdin reductase: cellular signaling and generation of cytoprotective and cytotoxic bilirubin. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 129–37.
- Kaplan, D., Ferrari, I., Bergami, P.L., Mahler, E., Levitus, G., Chiale, P., Hoebeke, J., Van Regenmortel, M.H., Levin, M.J., 1997. Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10301–6.
- Kapp, E.A., Schütz, F., Connolly, L.M., Chakel, J.A., Meza, J.E., Miller, C.A., Fenyo, D., Eng, J.K., Adkins, J.N., Omenn, G.S., Simpson, R.J., 2005. An evaluation, comparison, and accurate benchmarking of several publicly available MS/MS search algorithms: Sensitivity and specificity analysis. *Proteomics* 5, 3475–3490.
- Karas, M., Hillenkamp, F., 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60, 2299–2301.
- Katkansky, S.C., Dahlstrom, W.A., Warner, R.W., 1969. Observations on survival and growth of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in California. *Calif. Fish Game* 55, 69–74.
- Kawabe, S., Yokoyama, Y., 2012. Role of Hypoxia-Inducible Factor alpha in Response to Hypoxia and Heat Shock in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biotechnol.* 14, 106–119.
- Kawai, T., Akira, S., 2011. Regulation of innate immune signalling pathways by the tripartite motif (TRIM) family proteins. *EMBO Mol. Med.* 3, 513–527.
- Kellogg, M., Cornwell, J., Owens, M., Paynter, K., 2013. Denitrification and nutrient assimilation on a restored oyster reef. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 480, 1–19.
- Kemp, I.K., Coyne, V.E., 2011. Identification and characterisation of the Mpeg1 homologue in the South African abalone, *Haliotis midae*. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 754–764.
- Kennedy, V., Newell, R., Krantz, G., Otto, S., 1995. Reproductive capacity of the eastern oyster *Crassostrea virginica* infected with the parasite *Perkinsus marinus*. *Dis. Aquat. Organ.* 23, 135–144.
- Kern, F.G., 1993. Shellfish health inspections of Chilean and Australian oysters, in: *Journal of Shellfish Research.* p. 366.
- Khadaroo, R.G., Kapus, A., Powers, K.A., Cybulsky, M.I., Marshall, J.C., Rotstein, O.D., 2003. Oxidative Stress Reprograms Lipopolysaccharide Signaling via Src Kinase-dependent Pathway in RAW 264.7 Macrophage Cell Line. *J. Biol. Chem.* 278, 47834–47841.
- Kieffer, A.E., Goumon, Y., Ruh, O., Chasserot-Golaz, S., Nullans, G., Gasnier, C., Aunis, D., Metz-Boutigue, M.H., 2003. The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *FASEB J.* 17, 776–778.
- Kile, B.T., Nicola, N.A., Alexander, W.S., 2001. Negative regulators of cytokine signaling. *Int. J. Hematol.* 73, 292–298.
- Kilpatrick, D.C., 2002. Animal lectins: A historical introduction and overview. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*
- Kim, Y.H., Cho, K., Yun, S.H., Kim, J.Y., Kwon, K.H., Yoo, J.S., Kim, S. Il, 2006. Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida* KT 2440 using a combined proteomic approach: 2-DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis. *Proteomics* 6, 1301–1318.
- Kim, J.Y., Adhya, M., Cho, S.K., Choi, K.S., Cho, M., 2008. Characterization, tissue expression, and immunohistochemical localization of MCL3, a C-type lectin produced by *Perkinsus olseni*-infected Manila clams (*Ruditapes philippinarum*). *Fish Shellfish Immunol.* 25, 598–603.

- Kingtong, S., Kellner, K., Bernay, B., Goux, D., Sourdain, P., Berthelin, C.H., 2013. Proteomic identification of protein associated to mature spermatozoa in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Proteomics* 82, 81–91.
- Kiningham, K., Kasarskis, E., 1998. Antioxidant function of metallothioneins. *J. Trace Elem. Exp. Med.*
- Kiniwa, Y., Li, J., Wang, M., Sun, C., Lee, J.E., Wang, R.-F., Wang, H.Y., 2015. Identification of DRG-1 As a Melanoma-Associated Antigen Recognized by CD4+ Th1 Cells. *PLoS One* 10, e0124094.
- Kinsey, S.T., Lee, B.C., 2003. The effects of rapid salinity change on in vivo arginine kinase flux in the juvenile blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 135, 521–531.
- Kirby, M.X., 2004. Fishing down the coast: historical expansion and collapse of oyster fisheries along continental margins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13096–13099.
- Kishore, U., Gaboriaud, C., Waters, P., Shrive, A.K., Greenhough, T.J., Reid, K.B.M., Sim, R.B., Arlaud, G.J., 2004. C1q and tumor necrosis factor superfamily: Modularity and versatility. *Trends Immunol.*
- Kiss, T., 2010. Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis* 15, 313–21.
- Kling, P., Norman, A., Andersson, P.L., Norrgren, L., Förlin, L., 2008. Gender-specific proteomic responses in zebrafish liver following exposure to a selected mixture of brominated flame retardants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 319–327.
- Klose, J., 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26, 231–243.
- Ko, M.S., Kim, H.J., Kim, H.K., Yoon, N.A., Lee, U.H., Lee, S.C., Chung, D.K., Lee, B.J., Suh, J.H., Cho, W.J., Park, J.W., 2014. Developmentally regulated GTP-binding protein 2 ameliorates EAE by suppressing the development of TH17 cells. *Clin. Immunol.* 150, 225–235.
- Kolarich, D., Lepenies, B., Seeberger, P.H., 2012. Glycomics, glycoproteomics and the immune system. *Curr. Opin. Chem. Biol.*
- Komatsuzawa, H., Ohta, K., Labischinski, H., Sugai, M., Suginaka, H., 1999. Characterization of *fmtA*, a gene that modulates the expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2121–5.
- Kong, P., Wang, L., Zhang, H., Song, X., Zhou, Z., Yang, J., Qiu, L., Wang, L., Song, L., 2011. A novel C-type lectin from bay scallop *Argopecten irradians* (AiCTL-7) agglutinating fungi with mannose specificity. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 836–844.
- Koopman, W.J.H., Nijtmans, L.G.J., Dieteren, C.E.J., Roostenberg, P., Valsecchi, F., Smeitink, J.A.M., Willems, P.H.G.M., 2010. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 1431–70.
- Kopitar-Jerala, N., 2006. The role of cystatins in cells of the immune system. *FEBS Lett.*
- Kourtidis, A., Scouras, Z.G., 2005. Analysis and characterization of the transcriptional unit of a new *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia) hsp70 gene. *DNA Seq.* 16, 36–43.
- Kourtidis, A., Drosopoulou, E., Nikolaidis, N., Hatzi, V.I., Chintiroglou, C.C., Scouras, Z.G., 2006. Identification of several cytoplasmic HSP70 genes from the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and their long-term evolution in Mollusca and Metazoa. *J. Mol. Evol.* 62, 446–459.
- Kovacevic, Z., Chikhani, S., Lui, G.Y.L., Sivagurunathan, S., Richardson, D.R., 2012. The Iron-Regulated Metastasis Suppressor NDRG1 Targets NEDD4L, PTEN, and SMAD4

- and Inhibits the PI3K and Ras Signaling Pathways. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 120508084456001.
- Koyanagi, M., Nakabayashi, K., Fujimoto, T., Gu, N., Baba, I., Takashima, Y., Doi, K., Harada, H., Kato, N., Sasazuki, T., Shirasawa, S., 2008. ZFAT expression in B and T lymphocytes and identification of ZFAT-regulated genes. *Genomics* 91, 451–457.
- Kozak, M., 1999. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234, 187–208.
- Krammer, P.H., 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*.
- Krauss, S., Brand, M.D., Buttgerit, F., 2001. Signaling takes a breath--new quantitative perspectives on bioenergetics and signal transduction. *Immunity* 15, 497–502.
- Kroeck, M.A., Montes, J., 2005. Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in flat oysters *Ostrea puelchana* farmed in San Antonio Bay (Argentina). *Dis. Aquat. Organ.* 63, 231–235.
- Kubota, K., Wakabayashi, K., Matsuoka, T., 2003. Proteome analysis of secreted proteins during osteoclast differentiation using two different methods: Two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tags analysis with two-dimensional chromatography. *Proteomics* 3, 616–626.
- Kucharova, V., Wiker, H.G., 2014. Proteogenomics in microbiology: Taking the right turn at the junction of genomics and proteomics. *Proteomics* 14, 2360–2675.
- Kuchel, R.P., Raftos, D. a., Birch, D., Vella, N., 2010. Haemocyte morphology and function in the Akoya Pearl Oyster, *Pinctada imbricata*. *J. Invertebr. Pathol.* 105, 36–48.
- Kumar, N.S., Bhamidimarri, P.M., 2015. Lysosomal Enzymes and their Receptors in Invertebrates: An Evolutionary Perspective. *Curr. Protein Pept. Sci.* 16, 49–65.
- Kumazawa, N.H., Morimoto, N., Okamoto, Y., 1993. Luminol-dependent chemiluminescence of hemocytes derived from marine and estuarine molluscs. *J. Vet. Med. Sci.* 55, 287–290.
- Kuruvilla, F.G., Shamji, A.F., Sternson, S.M., Hergenrother, P.J., Schreiber, S.L., 2002. Dissecting glucose signalling with diversity-oriented synthesis and small-molecule microarrays. *Nature* 416, 653–657.
- Kussmann, M., Raymond, F., Affolter, M., 2006. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. *J. Biotechnol.*
- Kuwasawa, K., Hill, R., 1997. Evidence for cholinergic inhibitory and serotonergic excitatory neuromuscular transmission in the heart of the bivalve *Mercenaria mercenaria*. *J. Exp. Biol.* 200, 2123–35.
- Kvetnansky, R., Sabban, E.L., Palkovits, M., 2009. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol. Rev.* 89, 535–606.
- Kwok, L.Y., Schlüter, D., Clayton, C., Soldati, D., 2004. The antioxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. *Mol. Microbiol.* 51, 47–61.
- Kwong, A.D., Rao, B.G., Jeang, K.-T., 2005. Viral and cellular RNA helicases as antiviral targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 845–853.
- La Peyre, J.F., Yarnall, H.A., Faisal, M., 1996. Contribution of *Perkinsus marinus* extracellular products in the infection of eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Invertebr. Pathol.* 68, 312–313.
- La Peyre, J.F., Xue, Q.-G., Itoh, N., Li, Y., Cooper, R.K., 2010. Serine protease inhibitor cvSI-1 potential role in the eastern oyster host defense against the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 84–92.
- Lacal, J.C., 1997. Regulation of proliferation and apoptosis by Ras and Rho GTPases through specific phospholipid-dependent signaling, in: *FEBS Letters*. pp. 73–77.
- Lacoste, A., Malham, S.K., Cueff, A., Poulet, S.A., 2001a. Noradrenaline modulates oyster



- hemocyte phagocytosis via a beta-adrenergic receptor-cAMP signaling pathway. *Gen. Comp. Endocrinol.* 122, 252–9.
- Lacoste, A., Malham, S.K., Cueff, A., Poulet, S.A., 2001b. Stress-Induced Catecholamine Changes in the Hemolymph of the Oyster *Crassostrea gigas*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 122, 181–188.
- Lacoste, A., Cueff, A., Poulet, S. a, 2002. P35-sensitive caspases, MAP kinases and Rho modulate beta-adrenergic induction of apoptosis in mollusc immune cells. *J. Cell Sci.* 115, 761–768.
- Lacy, P., Stow, J.L., 2011. Cytokine release from innate immune cells: Association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood*.
- Lafferty, K.D., Porter, J.W., Ford, S.E., 2004. Are diseases increasing in the ocean? *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35, 31–54.
- Lafferty, K.D., Dobson, A.P., Kuris, A.M., 2006. Parasites dominate food web links. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11211–11216.
- Lafont, M., Petton, B., Vergnes, A., Pualetto, M., Segarra, A., Gourbal, B., Montagnani, C., 2017. Long-lasting antiviral innate immune priming in the Lophotrochozoan Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Sci. Rep.* 7, 1–14.
- Lallias, D., Beaumont, A., Haley, C., 2008. QTL mapping for resistance to bonamiosis in the European flat oyster *Ostrea edulis*.
- Lambert, C., Soudant, P., Choquet, G., Paillard, C., 2003. Measurement of *Crassostrea gigas* hemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 225–240.
- Lambert, J.P., Ethier, M., Smith, J.C., Figeys, D., 2005. Proteomics: From gel based to gel free. *Anal. Chem.*
- Lambert, C., Soudant, P., Jegaden, M., Delaporte, M., Labreuche, Y., Moal, J., Samain, J.-F., 2007. In vitro modulation of reactive oxygen and nitrogen intermediate (ROI/RNI) production in *Crassostrea gigas* hemocytes. *Aquaculture* 270, 413–421.
- Lamberti, A., Caraglia, M., Longo, O., Marra, M., Abbruzzese, A., Arcari, P., 2004. The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: review article. *Amino Acids* 26, 443–448.
- Lane, H.S., Webb, S.C., Duncan, J., 2016. *Bonamia ostreae* in the New Zealand oyster *Ostrea chilensis*: a new host and geographic record for this haplosporidian parasite. *Dis. Aquat. Organ.* 118, 55–63.
- Lane, H.S., Jones, J.B., McDonald, W.L., 2017. Pooled sample testing for *Bonamia ostreae*: A tale of two SYBR Green real-time PCR assays. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 29, 752–756.
- Lane, H.S., Jones, B., Poulin, R., 2018. Comparative population genetic study of an important marine parasite from New Zealand flat oysters. *Mar. Biol.* 165, 9.
- Langhorst, M.F., Solis, G.P., Hannbeck, S., Plattner, H., Stuermer, C.A.O., 2007. Linking membrane microdomains to the cytoskeleton: Regulation of the lateral mobility of reggie-1/flotillin-2 by interaction with actin. *FEBS Lett.* 581, 4697–4703.
- Lauckner, G., 1983. Diseases of marine animals. Hamburgo, Alemania.
- Lauffer, H., Sagi, A., Ahl, J.S.B., Homola, E., 1992. Methyl farnesoate appears to be a crustacean reproductive hormone. *Invertebr. Reprod. Dev.* 22, 17–19.
- Le Bris, C., Paillard, C., Stiger-Pouvreau, V., Guérard, F., 2013. Laccase-like activity in the hemolymph of *Venerupis philippinarum*: Characterization and kinetic properties. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1804–1812.
- Le Deuff, R.M., Renault, T., Gérard, A., 1996. Effects of temperature on herpes-like virus detection among hatchery-reared larval Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dis. Aquat.*

- Organ. 24, 149–157.
- Le Gall, G., Bachere, E., Mialhe, E., 1991. Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulated with zymosan and host-specific Rickettsiales-like organisms. Dis. Aquat. Organ.
- Le Pennec, G., Le Pennec, M., 2003. Induction of glutathione-S-transferases in primary cultured digestive gland acini from the mollusk bivalve *Pecten maximus* (L.): Application of a new cellular model in biomonitoring studies. Aquat. Toxicol. 64, 131–142.
- Lee, Y., Wickamarachchi, W.D.N., Whang, I., Oh, M., Umasuthan, N., De Zoysa, M., Oh, C., Kang, D.H., Lee, J., 2013. Immune response-related gene expression profile of a novel molluscan IκB protein member from Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). Mol. Biol. Rep. 40, 1519–1527.
- Lehmann, F., Tiralongo, E., Tiralongo, J., 2006. Sialic acid-specific lectins: Occurrence, specificity and function. Cell. Mol. Life Sci.
- Leibowitz, M.P., Tavares, G.C., Pereira, F.L., Perdigão, C., Azevedo, V., Figueiredo, H.C.P., 2017. Shotgun Label-Free Proteomic Analyses of the Oyster Parasite *Perkinsus marinus*. J. Proteomics Genomics Res. 2, 13–21.
- Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E. V., Aravind, L., 2002. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. J. Mol. Biol. 317, 41–72.
- Lemos, M.F.L., Soares, A.M.V.M., Correia, A.C., Esteves, A.C., 2010. Proteins in ecotoxicology - How, why and why not? Proteomics.
- Lemus, M., Rojas, N., Rojas-Astudillo, L., Chung, K., 2013. Metallothioneins in *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae): seasonal variation and its relation to reproductive biology. Rev. Biol. Trop. 61, 701–9.
- Lenihan, H.S., Peterson, C.H., Byers, J.E., Grabowski, J.H., Thayer, G.W., Colby, D.R., 2001. Cascading of habitat degradation: Oyster reefs invaded by refugee fishes escaping stress. Ecol. Appl. 11, 764–782.
- Lennartz, M.R., 1999. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. Int. J. Biochem. Cell Biol. 31, 415–30.
- Lesk, A.M., 2002. Introduction to Bioinformatics. Oxford University Press, Oxford.
- Letendre, J., Chouquet, B., Manduzio, H., Marin, M., Bultelle, F., Leboulenger, F., Durand, F., 2009. Tidal height influences the levels of enzymatic antioxidant defences in *Mytilus edulis*. Mar. Environ. Res. 67, 69–74.
- Leulier, F., Lemaitre, B., 2008. Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. Nat. Rev. Genet. 9, 165–78.
- Leung, P.T.Y., Wang, Y., Mak, S.S.T., Ng, W.C., Leung, K.M.Y., 2011. Differential proteomic responses in hepatopancreas and adductor muscles of the green-lipped mussel *Perna viridis* to stresses induced by cadmium and hydrogen peroxide. Aquat. Toxicol. 105, 49–61.
- Levenson, J., Weeber, E., Sweatt, J., Eskin, A., 2002. Glutamate Uptake in Synaptic Plasticity: From Mollusc to Mammal. Curr. Mol. Med. 2, 593–603.
- Lewis, T.S., Shapiro, P.S., Ahn, N.G., 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv. Cancer Res. 74, 49–139.
- Li, B., Trueb, B., 2000. DRG represents a family of two closely related GTP-binding proteins. Biochim. Biophys. Acta 1491, 196–204.
- Li, C., Song, L., Zhao, J., Zhu, L., Zou, H., Zhang, H., Wang, H., Cai, Z., 2007. Preliminary study on a potential antibacterial peptide derived from histone H2A in hemocytes of scallop *Chlamys farreri*. Fish Shellfish Immunol. 22, 663–672.
- Li, C., Ni, D., Song, L., Zhao, J., Zhang, H., Li, L., 2008. Molecular cloning and



- characterization of a catalase gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Fish Shellfish Immunol. 24, 26–34.
- Li, C.H., Zhao, J.M., Song, L.S., 2009. A review of advances in research on marine molluscan antimicrobial peptides and their potential application in aquaculture. Molluscan Res. 29, 17–26.
- Li, C., Liang, J., Ma, Z., Hu, Y., Yan, Z., Li, Q., Fang, Z., Wang, H., Zhang, G., Xie, L., Zhang, R., 2010. Calcineurin mediates the immune response of hemocytes through NF-kappaB signaling pathway in pearl oyster (*Pinctada fucata*). Fish Shellfish Immunol. 28, 253–260.
- Li, D.-X., Du, X.-J., Zhao, X.-F., Wang, J.-X., 2006. Cloning and expression analysis of an O-methyltransferase (OMT) gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Fish Shellfish Immunol. 21, 284–92.
- Li, H., Parisi, M.G., Toubiana, M., Cammarata, M., Roch, P., 2008. Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. Fish Shellfish Immunol. 25, 143–152.
- Li, H., Sun, X., Cai, Z., Cai, G., Xing, K., 2010. Identification and analysis of a Cu/Zn superoxide dismutase from *Haliotis diversicolor supertexta* with abalone juvenile detached syndrome. J. Invertebr. Pathol. 103, 116–23.
- Li, J., Chen, J., Zhang, Y., Yu, Z., 2013. Expression of allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) in response to bacterial challenge and tissue injury in the pearl oyster, *Pinctada martensii*. Fish Shellfish Immunol. 34, 365–371.
- Li, J., Zhang, Y., Zhang, Y., Xiang, Z., Tong, Y., Qu, F., Yu, Z., 2014. Genomic characterization and expression analysis of five novel IL-17 genes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Fish Shellfish Immunol. 40, 1–11.
- Li, L., Chang, M.X., Nie, P., 2007. Molecular cloning, promoter analysis and induced expression of the complement component C9 gene in the grass carp *Ctenopharyngodon idella*. Vet. Immunol. Immunopathol. 118, 270–82.
- Li, L., Qiu, L., Song, L., Song, X., Zhao, J., Wang, L., Mu, C., Zhang, H., 2009. First molluscan TNFR homologue in Zhikong scallop: Molecular characterization and expression analysis. Fish Shellfish Immunol. 27, 625–632.
- Li, M., Qiu, L., Wang, L., Wang, W., Xin, L., Li, Y., Liu, Z., Song, L., 2016a. The inhibitory role of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) on immunomodulation of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Fish Shellfish Immunol. 52, 16–22.
- Li, M., Wang, L., Qiu, L., Wang, W., Xin, L., Xu, J., Wang, H., Song, L., 2016b. A glutamic acid decarboxylase (CgGAD) highly expressed in hemocytes of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Dev. Comp. Immunol. 63, 56–65.
- Li, Q., Imataka, H., Morino, S., Rogers, G.W., Richter-Cook, N.J., Merrick, W.C., Sonenberg, N., 1999. Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII. Mol. Cell. Biol. 19, 7336–46.
- Li, Q., Verma, I.M., 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. Nat. Rev. Immunol. 2, 725–734.
- Li, Q., Zhao, X., Kong, L., Yu, H., 2013. Transcriptomic response to stress in marine bivalves 84–93.
- Li, Y., Qin, J.G., Abbott, C.A., Li, X., Benkendorff, K., 2007. Synergistic impacts of heat shock and spawning on the physiology and immune health of *Crassostrea gigas*: an explanation for summer mortality in Pacific oysters. AJP Regul. Integr. Comp. Physiol. 293, R2353–R2362.
- Li, Y., Song, X., Wang, W., Wang, L., Yi, Q., Jiang, S., Jia, Z., Du, X., Qiu, L., Song, L.,

2017. The hematopoiesis in gill and its role in the immune response of Pacific oyster *Crassostrea gigas* against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Dev. Comp. Immunol.* 71, 59–69.
- Liang, P., MacRae, T.H., 1997. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 1), 1431–40.
- Liang, Y., Lin, J.C., Wang, K., Chen, Y.J., Liu, H.H., Luan, R., Jiang, S., Che, T., Zhao, Y., Li, D.F., 2010. A nuclear ligand MRG15 involved in the proapoptotic activity of medicinal fungal galectin AAL (*Agrocybe aegerita* lectin). *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1800, 474–480.
- Lien, E., Means, T.K., Heine, H., Yoshimura, A., Kusumoto, S., Fukase, K., Fenton, M.J., Oikawa, M., Qureshi, N., Monks, B., Finberg, R.W., Ingalls, R.R., Golenbock, D.T., 2000. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 105, 497–504.
- Liew, F.Y., Cox, F.E., 1991. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol. Today* 12, A17–A21.
- Lilley, K.S., Friedman, D.B., 2004. All about DIGE: quantification technology for differential-display 2D-gel proteomics. *Expert Rev. Proteomics* 1, 401–409.
- Lillig, C.H., Holmgren, A., 2007. Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 25–47.
- Lin, T., Zhang, D., Lai, Q., Sun, M., Quan, W., Zhou, K., 2014. A modified method to detect the phagocytic ability of eosinophilic and basophilic haemocytes in the oyster *Crassostrea plicatula*. *Fish Shellfish Immunol.* 40, 337–343.
- Lindquist, S., Craig, E.A., 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631–77.
- Linnaeus, C., 1758. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis.* *Phyt. Ann. rei Bot.* 1–824.
- Liska, A.J., Shevchenko, A., 2003. Expanding the organismal scope of proteomics: Cross-species protein identification by mass spectrometry and its implications. *Proteomics.*
- Liu, C., Li, S., Kong, J., Liu, Y., Wang, T., Xie, L., Zhang, R., 2015. In-depth proteomic analysis of shell matrix proteins of *Pinctada fucata*. *Nat. Publ. Gr.* 1–14.
- Liu, D., Chen, Z., Xu, H., 2008. Effects of leucine-enkephalin on catalase activity and hydrogen peroxide levels in the haemolymph of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Molecules* 13, 864–70.
- Liu, H.-H., Xiang, L.-X., Shao, J.-Z., 2014. A novel C1q-domain-containing (C1qDC) protein from *Mytilus coruscus* with the transcriptional analysis against marine pathogens and heavy metals. *Dev. Comp. Immunol.* 44, 70–5.
- Liu, L., Yang, J., Qiu, L., Wang, L., Zhang, H., Wang, M., Vinu, S.S., Song, L., 2011. A novel scavenger receptor-cysteine-rich (SRCR) domain containing scavenger receptor identified from mollusk mediated PAMP recognition and binding. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 227–239.
- Liu, M.K., Herrera-Velitz, P., Brownsey, R.W., Reiner, N.E., 1994. CD14-dependent activation of protein kinase C and mitogen-activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 153, 2642–52.
- Liu, W.G., Huang, X.-D., Wang, Q., Zhao, M., Wu, S.-Z., He, M.-X., 2013. Gene cloning and function analysis of cytokine-induced suppressor of cytokine signaling (SOCS) from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 849–54.
- Liu, Z., Zhou, Z., Wang, L., Jiang, S., Wang, W., Zhang, R., Song, L., 2015a. The immunomodulation mediated by a delta-opioid receptor for [Met5]-enkephalin in oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 49, 217–224.

- Liu, Z., Zhou, Z., Wang, L., Song, X., Chen, H., Wang, W., Liu, R., Wang, M., Wang, H., Song, L., 2015b. The enkephalinergic nervous system and its immunomodulation on the developing immune system during the ontogenesis of oyster *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 45, 250–259.
- Liu, Z., Wang, L., Zhou, Z., Sun, Y., Wang, M., Wang, H., Hou, Z., Gao, D., Gao, Q., Song, L., 2016a. The simple neuroendocrine-immune regulatory network in oyster *Crassostrea gigas* mediates complex functions. *Sci. Rep.* 6, 26396.
- Liu, Z., Zhou, Z., Wang, L., Dong, W., Qiu, L., Song, L., 2016b. The cholinergic immune regulation mediated by a novel muscarinic acetylcholine receptor through TNF pathway in oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 65, 139–148.
- Liu, Z., Zhou, Z., Wang, L., Qiu, L., Zhang, H., Wang, H., Song, L., 2016c. CgA1AR-1 acts as an alpha-1 adrenergic receptor in oyster *Crassostrea gigas* mediating both cellular and humoral immune response. *Fish Shellfish Immunol.* 58, 50–58.
- Liu, Z., Zhou, Z., Jiang, Q., Wang, L., Yi, Q., Qiu, L., Song, L., 2017. The neuroendocrine immunomodulatory axis-like pathway mediated by circulating haemocytes in pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Open Biol.* 7, 160289.
- Lockshin, R.A., Zakeri, Z., 2004. Caspase-independent cell death? *Oncogene* 23, 2766–2773.
- Lockyer, A.E., Spinks, J.N., Walker, A.J., Kane, R.A., Noble, L.R., Rollinson, D., Dias-Neto, E., Jones, C.S., 2007. *Biomphalaria glabrata* transcriptome: identification of cell-signalling, transcriptional control and immune-related genes from open reading frame expressed sequence tags (ORESTES). *Dev. Comp. Immunol.* 31, 763–82.
- Lockyer, A.E., Spinks, J., Kane, R.A., Hoffmann, K.F., Fitzpatrick, J.M., Rollinson, D., Noble, L.R., Jones, C.S., 2008. *Biomphalaria glabrata* transcriptome: cDNA microarray profiling identifies resistant- and susceptible-specific gene expression in haemocytes from snail strains exposed to *Schistosoma mansoni*. *BMC Genomics* 9, 634.
- Lockyer, A.E., Emery, A.M., Kane, R.A., Walker, A.J., Mayer, C.D., Mitta, G., Coustau, C., Adema, C.M., Hanelt, B., Rollinson, D., Noble, L.R., Jones, C.S., 2012. Early differential gene expression in haemocytes from resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* strains in response to *Schistosoma mansoni*. *PLoS One* 7, e51102.
- Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.M., Kepler, T.B., 2004. Invertebrate immune systems - Not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol. Rev.*
- Longshaw, M., Stone, D.M., Wood, G., Green, M.J., White, P., 2013. Detection of *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) in European flat oysters *Ostrea edulis* cultivated in mainland Britain. *Dis. Aquat. Organ.* 106, 173–179.
- Loo YM, Gale M, 2011. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity* 34, 680–692.
- López-Flores, I., Suárez-Santiago, V.N., Longet, D., Saulnier, D., Chollet, B., Arzul, I., 2007. Characterization of actin genes in *Bonamia ostreae* and their application to phylogeny of the Haplosporidia. *Parasitology* 134, 1941–8.
- López, C., Carballed, M., Azevedo, C., Villalba, A., 1997a. Differential phagocytic ability of the circulating haemocyte types of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca:Bivalvia). *Dis. Aquat. Organ.* 30, 209–215.
- López, C., Carballed, M.J., Azevedo, C., Villalba, A., 1997b. Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *J. Invertebr. Pathol.* 69, 51–57.
- López, C., Carballed, M.J., Azevedo, C., Villalba, A., 1997c. Enzyme characterisation of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca bivalvia). *Fish& Shellfish Immunol.* 7, 595–608.
- López, J.L., Mosquera, E., Fuentes, J., Marina, A., Vázquez, J., Alvarez, G., 2001. Two-

- dimensional gel electrophoresis of *Mytilus galloprovincialis*: Differences in protein expression between intertidal and cultured mussels. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 224, 149–156.
- López, J.L., Abalde, S.L., Fuentes, J., 2005. Proteomic approach to probe for larval proteins of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biotechnol.* 7, 396–404.
- López, J.L., 2007. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*
- Lotze, H.K., Lenihan, H.S., Bourque, B.J., Bradbury, R.H., Cooke, R.G., Kay, M.C., Kidwell, S.M., Kirby, M.X., Peterson, C.H., Jackson, J.B.C., 2006. Depletion, degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. *Science* 312, 1806–1809.
- Lovett, D.L., Verzi, M.P., Clifford, P.D., Borst, D.W., 2001. Hemolymph levels of methyl farnesoate increase in response to osmotic stress in the green crab, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 128, 299–306.
- Lowe, M.E., 2000. Properties and function of pancreatic lipase related protein 2. *Biochimie* 82, 997–1004.
- Lowenstein, C.J., Glatt, C.S., Bredt, D.S., Snyder, S.H., 1992. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6711–6715.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lu, J., Meng, W., Poy, F., Maiti, S., Goode, B.L., Eck, M.J., 2007. Structure of the FH2 Domain of Daam1: Implications for Formin Regulation of Actin Assembly. *J. Mol. Biol.* 369, 1258–1269.
- Lubet, P., Mann, R., 1987. Les différentes modalités de la reproduction chez les mollusques bivalves. *Ann. l'Institut Michel Pacha* 29–42.
- Lüking, a, Stahl, U., Schmidt, U., 1998. The protein family of RNA helicases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33, 259–96.
- Luna-acosta, A., Saulnier, D., Pommier, M., Haffner, P., Decker, S. De, Renault, T., Thomasguyon, H., 2011. First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 795–800.
- Luo, M., Ye, S., Xu, T., Wu, X., Yang, P., 2012. Molecular characterization of a novel tetraspanin from the oyster, *Crassostrea ariakensis*: Variation, localization and relationship to oyster host defense. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 294–304.
- Luo, L., Ke, C., Guo, X., Shi, B., Huang, M., 2014. Metal accumulation and differentially expressed proteins in gill of oyster (*Crassostrea hongkongensis*) exposed to long-term heavy metal-contaminated estuary. *Fish Shellfish Immunol.* 38, 318–329.
- Lynch, S.A., Armitage, D. V, Wylde, S., Mulcahy, M.F., Culloty, S.C., 2005. The susceptibility of young prespawning oysters, *Ostrea edulis*, to *Bonamia ostreae*. *J. Shellfish Res.* 24, 1019–1025.
- Lynch, S. A, Armitage, D. V, Coughlan, J., Mulcahy, M.F., Culloty, S.C., 2007. Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplankton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. *Exp. Parasitol.* 115, 359–68.
- Lynch, S. A, Abollo, E., Ramilo, A, Cao, A, Culloty, S.C., Villalba, A, 2010. Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitology* 137, 1515–26.
- Lynch, S.A.S., Flannery, G., Hugh-Jones, T., Hugh-Jones, D., Culloty, S.S.C., 2014. Thirty-year history of Irish (Rossmore) *Ostrea edulis* selectively bred for disease resistance to *Bonamia ostreae*. *Dis. Aquat. Organ.* 110, 113–121.

- Maccarrone, G., Turck, C.W., Martins-De-souza, D., 2010. Shotgun mass spectrometry workflow combining IEF and LC-MALDI-TOF/TOF. *Protein J.* 29, 99–102.
- MacKenzie, C.L., 1997. The history, present condition, and future of the molluscan fisheries of North and Central America and Europe [microform] / Clyde L. MacKenzie, Jr (editors), NOAA technical report NMFS: 127-129.
- Madsen, L., Thomassen, H., Hou, E., 2015. First detection of *Bonamia ostreae* in native flat oysters from the limfjord in denmark., in: 17th International Conference on Diseases of Fish And Shellfish. p. 92.
- Mah, S.A., Moy, G.W., Swanson, W.J., Vacquier, V.D., 2004. A perforin-like protein from a marine mollusk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316, 468–475.
- Mahadav, A., Gerling, D., Gottlieb, Y., Czosnek, H., Ghanim, M., 2008. Parasitization by the wasp *Eretmocerus mundus* induces transcription of genes related to immune response and symbiotic bacteria proliferation in the whitefly *Bemisia tabaci*. *BMC Genomics* 9, 342.
- Makowsky, R., Pajewski, N.M., Klimentidis, Y.C., Vazquez, A.I., Duarte, C.W., Allison, D.B., de los Campos, G., 2011. Beyond missing heritability: Prediction of complex traits. *PLoS Genet.* 7.
- Malecz, N., McCabe, P.C., Spaargaren, C., Qiu, R., Chuang, Y., Symons, M., 2000. Synaptojanin 2, a novel Rac1 effector that regulates clathrin-mediated endocytosis. *Curr. Biol.* 10, 1383–6.
- Manfrin, C., De Moro, G., Torboli, V., Venier, P., Pallavicini, A., 2012. Physiological and molecular responses of bivalves to toxic dinoflagellates. *Isj* 184–199.
- Mann, M., Hendrickson, R.C., Pandey, A., 2001. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 437–473.
- Mann, M., Pandey, A., 2001. Use of mass spectrometry-derived data to annotate nucleotide and protein sequence databases. *Trends Biochem. Sci.*
- Mao, Y., Zhou, C., Zhu, L., Huang, Y., Yan, T., Fang, J., Zhu, W., 2013. Identification and expression analysis on bactericidal permeability-increasing protein (BPI)/lipopolysaccharide-binding protein (LBP) of ark shell, *Scapharca broughtonii*. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 642–52.
- March, R.E., 2009. Quadrupole ion traps. *Mass Spectrom. Rev.* 28, 961–989.
- Marcos, M., Angel, P., 2015. Subtle tissue and sex-dependent proteome variation in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) populations of the Galician coast (NW Spain) raised in a common 3993–4006.
- Marie, B., Trinkler, N., Zanella-Cleon, I., Guichard, N., Becchi, M., Paillard, C., Marin, F., 2011. Proteomic Identification of Novel Proteins from the Calcifying Shell Matrix of the Manila Clam *Venerupis philippinarum*. *Mar. Biotechnol.* 13, 955–962.
- Marie, B., Joubert, C., Tayalé, A., Zanella-Cléon, I., Belliard, C., Piquemal, D., Cochenec-Laureau, N., Marin, F., Gueguen, Y., Montagnani, C., 2012. Different secretory repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 20986–91.
- Markham, G.D., Pajares, M.A., 2009. Structure-function relationships in methionine adenosyltransferases. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 636–648.
- Marteil, L., 1976. La conchyliculture française. 2eme partie. Biologie de l'huître et de la moule. *Rev. des Trav. l'Institut des Pêches Marit.* 40, 149–346.
- Martín-Gómez, L., Villalba, A., Abollo, E., 2012. Identification and expression of immune genes in the flat oyster *Ostrea edulis* in response to bonamiosis. *Gene* 492, 81–93.
- Martín-Gómez, L., Villalba, A., Carballal, M.J., Abollo, E., 2013. Identification of relevant cancer related-genes in the flat oyster *Ostrea edulis* affected by disseminated neoplasia.



- Mar. Biotechnol. (NY). 15, 159–74.
- Martín-Gómez, L., Villalba, A., Carballal, M.J., Abollo, E., 2014a. Molecular characterisation of TNF, AIF, dermatopontin and VAMP genes of the flat oyster *Ostrea edulis* and analysis of their modulation by diseases. *Gene* 533, 208–217.
- Martín-Gómez, L., Villalba, A., Carballal, M.J., Abollo, E., 2014b. Cloning and characterization of neoplasia-related genes in flat oyster *Ostrea edulis*. *Infect. Genet. Evol.* 23, 138–149.
- Martin, J.F., Ullan, R. V., Casqueiro, J., 2004. Novel genes involved in cephalosporin biosynthesis: the three-component isopenicillin N epimerase system. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 88, 91–109.
- Martinez-Cruz, O., Sanchez-paz, A., 2009. Invertebrates Mitochondrial Function and Energetic Challenges.
- Martínez-Fernández, M., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Oliveira, E., De La Cadena, M.P., Rolán-Alvarez, E., 2008. Proteomic comparison between two marine snail ecotypes reveals details about the biochemistry of adaptation. *J. Proteome Res.* 7, 4926–4934.
- Martins, J.C., Campos, A., Osório, H., da Fonseca, R., Vasconcelos, V., 2014. Proteomic profiling of cytosolic glutathione transferases from three bivalve species: *Corbicula fluminea*, *Mytilus galloprovincialis* and *Anodonta cygnea*. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 1887–1900.
- Marty, G.D., Bower, S.M., Clarke, K.R., Meyer, G., Lowe, G., Osborn, A.L., Chow, E.P., Hannah, H., Byrne, S., Sojonky, K., Robinson, J.H., 2006. Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada. *Aquaculture* 261, 33–42.
- Mary, J., Rogniaux, H., Rees, J.F., Zal, F., 2010. Response of *Alvinella pompejana* to variable oxygen stress: A proteomic approach. *Proteomics* 10, 2250–2258.
- Masood, M., Raftos, D.A., Nair, S. V., 2016. Two Oyster Species That Show Differential Susceptibility to Virus Infection Also Show Differential Proteomic Responses to Generic dsRNA. *J. Proteome Res.* 15, 1735–1746.
- Masood, M., Herberstein, M.E., Raftos, D.A., Nair, S. V., 2017. Double stranded RNA is processed differently in two oyster species. *Dev. Comp. Immunol.* 76, 285–291.
- Mathers, N.F., 1973. A comparative histochemical survey of enzymes associated with the process of digestion in *Ostrea edulis* and *Crassostrea angulata* (Mollusca: Bivalvia). *J. Zool. London* 169, 169–179.
- Mathieu, M., Lubet, P., 1993. Storage tissue metabolism and reproduction in bivalves - a brief review. *Invertebr. Reprod. Dev.* 23, 123–129.
- Matozzo, V., Ballarin, L., Pampanin, D.M., Marin, M.G., 2001. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41, 163–170.
- Matozzo, V., Marin, M.G., Cima, F., Ballarin, L., 2008. First evidence of cell division in circulating haemocytes from the Manila clam *Tapes philippinarum*. *Cell Biol. Int.* 32, 865–868.
- Matozzo, V., Rova, G., Marin, M.G., 2007. Haemocytes of the cockle *Cerastoderma glaucum*: Morphological characterisation and involvement in immune responses. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 732–746.
- Matozzo, V., Bailo, L., 2015. A first insight into haemocytes of the smooth venus clam *Callista chione*. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 494–502.
- Matozzo, V., Pagano, M., Spinelli, A., Caicci, F., Faggio, C., 2016. *Pinna nobilis*: A big bivalve with big haemocytes? *Fish Shellfish Immunol.* 55, 529–534.
- Matrangolo, F.S. V, Liarte, D.B., Andrade, L.C., de Melo, M.F., Andrade, J.M., Ferreira,

- R.F., Santiago, A.S., Pirovani, C.P., Silva-Pereira, R. a, Murta, S.M.F., 2013. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. *Mol. Biochem. Parasitol.* 190, 63–75.
- Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., Nagano, Y., Doi, T., Shimotohno, K., Harada, T., Nishida, E., Hayashi, H., Sugano, S., 2003. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 22, 3307–3318.
- Matsumoto, T., Nakamura, A.M., Takahashi, K.G., 2006. Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 145, 325–330.
- Matsunaga-Udagawa, R., Fujita, Y., Yoshiki, S., Terai, K., Kamioka, Y., Kiyokawa, E., Yugi, K., Aoki, K., Matsuda, M., 2010. The scaffold protein Shoc2/SUR-8 accelerates the interaction of Ras and Raf. *J. Biol. Chem.* 285, 7818–7826.
- Matsuno, A., Kuga, H., 1989. Ultrastructure of Muscle Cells in the Adductor of the Boring Clam *Tridacna crocea* 253, 247–253.
- May, R.C., Machesky, L.M., 2001. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 114, 1061–1077.
- Mayer, A.M., Staples, R.C., 2002. Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60, 551–565.
- Mayevsky, A., Rogatsky, G.G., 2007. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C615–40.
- McArdle, J.F., McKiernan, F., Foley, H., Jones, D.H., 1991. The current status of Bonamia disease in Ireland. *Aquaculture* 93, 273–278.
- McDonagh, B., Tyther, R., Sheehan, D., 2005. Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 73, 315–26.
- McDowell, I.C., Nikapitiya, C., Aguiar, D., Lane, C.E., Istrail, S., Gomez-Chiarri, M., 2014. Transcriptome of American oysters, *Crassostrea virginica*, in response to bacterial challenge: Insights into potential mechanisms of disease resistance. *PLoS One* 9.
- McGettrick, A.F., O'Neill, L.A.J., 2004. The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Mol. Immunol.*
- McGreal, E.P., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., 2004. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol. Immunol.*
- McHenry, J.G., Birkbeck, T.H., 1982. Characterization of the lysozyme of *Mytilus edulis* (L). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 71, 583–589.
- McLeod, R., Mack, D., Brown, C., 1991. *Toxoplasma gondii*-new advances in cellular and molecular biology. *Exp. Parasitol.* 72, 109–121.
- McMahon, M., Itoh, K., Yamamoto, M., Hayes, J.D., 2003. Keap1-dependent Proteasomal Degradation of Transcription Factor Nrf2 Contributes to the Negative Regulation of Antioxidant Response Element-driven Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 278, 21592–21600.
- McNab, F.W., Rajsbaum, R., Stoye, J.P., O'Garra, A., 2011. Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 46–56.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 4–9.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 1998. Self-defense: the fruit fly style. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 429–30.



- Medzhitov, R., Janeway, C., 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* 173, 89–97.
- Medzhitov, R., 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 135–45.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298–300.
- Meister, M., 2004. Blood cells of *Drosophila*: Cell lineages and role in host defence. *Curr. Opin. Immunol.*
- Meistertzheim, A.-L., Tanguy, A., Moraga, D., Thébault, M.-T., Thebault, M.T., 2007. Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. *FEBS J.* 274, 6392–6402.
- Meyer-Hoffert, U., Wiedow, O., 2011. Neutrophil serine proteases: mediators of innate immune responses. *Curr. Opin. Hematol.* 18, 19–24.
- Mi, J., Orbea, A., Syme, N., Ahmed, M., Cajaraville, M.P., Cristobal, S., 2005. Peroxisomal proteomics, a new tool for risk assessment of peroxisome proliferating pollutants in the marine environment. *Proteomics.*
- Mi, J., Apraiz, I., Cristobal, S., 2007. Peroxisomal proteomic approach for protein profiling in blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to crude oil. *Biomarkers* 12, 47–60.
- Mialhe, E., Bachère, E., Chagot, D., Grizel, H., 1988. Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.* 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture.*
- Miao, J., Chi, L., Pan, L., Song, Y., 2015. Generally detected genes in comparative transcriptomics in bivalves: Toward the identification of molecular markers of cellular stress response. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 475–481.
- Millman, B.M., 1964. Contraction in the opaque part of the adductor muscle of the oyster (*Crassostrea angulata*). *J. Physiol.* 173, 238–62.
- Minamikawa, M., Hinc, M., Russell, S., Huber, P., Duignan, P., Lumsden, J.S., 2004. Isolation and partial characterization of a calcium-dependent lectin (chiletin) from the haemolymph of the flat oyster, *Ostrea chilensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 17, 463–476.
- Mitta, G., Hubert, F., Noël, T., Roch, P., 1999a. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem.* 265, 71–78.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Roch, P., 1999b. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 2, 4233–4242.
- Mitta, G., Hubert, F., Dyrinda, E.A., Boudry, P., Roch, P., 2000a. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: Gene structure and expression analysis. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 381–393.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzert, M., Roch, P., 2000b. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.* 275, 12954–12962.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Noël, T., Romestand, B., Beauvillain, J.C., Salzert, M., Roch, P., 2000c. Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 1, 2759–2769.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Roch, P., 2000d. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.*
- Miura, Y., Kano, M., Abe, K., Urano, S., Suzuki, S., Toda, T., 2005. Age-dependent variations of cell response to oxidative stress: Proteomic approach to protein expression and phosphorylation. *Electrophoresis* 26, 2786–2796.
- Miyamoto, H., Hamaguchi, M., Okoshi, K., 2002. Analysis of genes expressed in the mantle of oyster *Crassostrea gigas*. *Fish. Sci.* 68, 651–658.

- Mohandas, A., Cheng, T.C., Cheng, J.B., 1985. Mechanism of lysosomal enzyme release from *Mercenaria mercenaria* granulocytes: a scanning electron microscope study. *J. Invertebr. Pathol.* 46, 189–197.
- Molloy, M.P., 2000. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal. Biochem.* 280, 1–10.
- Molnar, J.L., Gamboa, R.L., Revenga, C., Spalding, M.D., 2008. Assessing the global threat of invasive species to marine biodiversity. *Front. Ecol. Environ.*
- Monari, M., Matozzo, V., Foschi, J., Marin, M.G., Cattani, O., 2005. Exposure to anoxia of the clam, *Chamelea gallina*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 325, 175–188.
- Monari, M., Matozzo, V., Foschi, J., Cattani, O., Serrazanetti, G.P., Marin, M.G., 2007. Effects of high temperatures on functional responses of haemocytes in the clam *Chamelea gallina*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 98–114.
- Monari, M., Foschi, J., Matozzo, V., Marin, M.G., Fabbri, M., Rosmini, R., Serrazanetti, G.P., 2009. Investigation of EROD, CYP1A immunopositive proteins and SOD in haemocytes of *Chamelea gallina* and their role in response to B[a]P. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 382–392.
- Monsinjon, T., Knigge, T., 2007. Proteomic applications in ecotoxicology. *Proteomics.*
- Montagnani, C., Le Roux, F., Berthe, F., Escoubas, J.-M., 2001. Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms. *FEBS Lett.*
- Montagnani, C., Kappler, C., Reichhart, J.M., Escoubas, J.M., 2004. Cg-Rel, the first Rel/NF-kappaB homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Lett.* 561, 75–82.
- Montagnani, C., Avarre, J.C., de Lorgeril, J., Quiquand, M., Boulo, V., Escoubas, J.M., 2007. First evidence of the activation of Cg-timp, an immune response component of pacific oysters, through a damage-associated molecular pattern pathway. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 1–11.
- Montagnani, C., Labreuche, Y., Escoubas, J.M., 2008. Cg-I kappa B, a new member of the I kappa B protein family characterized in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 182–190.
- Montes, J., Melendez, I., 1987. Data on the parasitism of *Bonamia ostreae* in the flat oyster of Galicia, north-west coast of Spain. *Aquaculture* 67, 195–198.
- Montes, J., Villalba, A., López, M.C., Carballal, M.J., Mourelle, S.G., 1991. Bonamiasis in native flat oysters (*Ostrea edulis* L.) from two intertidal beds of the Ortigueira estuary (Galicia, N.W. Spain) with different histories of oyster culture. *Aquaculture* 93, 213–224.
- Montes, J., Anadón, R., Azevedo, C., 1994. A Possible Life Cycle for *Bonamia ostreae* on the Basis of Electron Microscopy Studies. *J. Invertebr. Pathol.* 63, 1–6.
- Montes, J.F., Durfort, M., Garcia-Valero, J., 1995. Cellular defence mechanism of the clam *Tapes semidecussatus* against infection by the protozoan *Perkinsus* sp. *Cell Tissue Res.* 279, 529–538.
- Montes, J., Longa, M.A., Lama, A., Guerra, A., 1998. Marteiliosis of Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) reared in Galicia NW Spain. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 18, 124–126.
- Montes, J., Ferro-Soto, B., Conchas, R.F., Guerra, A., 2003. Determining culture strategies in populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, affected by bonamiasis. *Aquaculture* 220, 175–182.
- Moore, C.A., Eble, A.F., 1977. Cytochemical aspects of *Mercenaria mercenaria* hemocytes. *Biol. Bull.* 152, 105–119.

- Moore, M.N., Lowe, D.M., 1977. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. *J. Invertebr. Pathol.*
- Moore, M.N., Koehn, R.K., Bayne, B.L., 1980. Leucine aminopeptidase (aminopeptidase-I), N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase and lysosomes in the mussel, *Mytilus edulis* L., in response to salinity changes. *J. Exp. Zool.* 214, 239–249.
- Moreau, P., Moreau, K., Segarra, A., Tourbiez, D., Travers, M.A., Rubinsztein, D.C., Renault, T., 2015. Autophagy plays an important role in protecting Pacific oysters from OsHV-1 and *Vibrio aestuarianus* infections. *Autophagy* 11, 516–526.
- Moreira, S.M., Guilhermino, L., 2005. The use of *Mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione S-transferases activities as biomarkers of environmental contamination along the northwest Portuguese coast. *Environ. Monit. Assess.* 105, 309–325.
- Moreira, R., Balseiro, P., Planas, J. V., Fuste, B., Beltran, S., Novoa, B., Figueras, A., 2012a. Transcriptomics of in vitro immune-stimulated hemocytes from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing. *PLoS One* 7, e35009.
- Moreira, R., Balseiro, P., Romero, A., Dios, S., Posada, D., Novoa, B., Figueras, A., 2012b. Gene expression analysis of clams *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* following bacterial infection yields molecular insights into pathogen resistance and immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 140–149.
- Moreira, R., Milan, M., Balseiro, P., Romero, A., Babbucci, M., Figueras, A., Bargelloni, L., Novoa, B., 2014. Gene expression profile analysis of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) hemocytes after a *Vibrio alginolyticus* challenge using an immune-enriched oligo-microarray. *BMC Genomics* 15, 267.
- Morga, B., Arzul, I., Chollet, B., Renault, T., 2009. Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies in vitro haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 836–42.
- Morga, B., Arzul, I., Faury, N., Renault, T., 2010. Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 937–45.
- Morga, B., Arzul, I., Faury, N., Segarra, A., Chollet, B., Renault, T., 2011a. Molecular responses of *Ostrea edulis* haemocytes to an in vitro infection with *Bonamia ostreae*. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 323–33.
- Morga, B., Renault, T., Faury, N., Chollet, B., Arzul, I., 2011b. Cellular and molecular responses of haemocytes from *Ostrea edulis* during in vitro infection by the parasite *Bonamia ostreae*. *Int. J. Parasitol.* 41, 755–64.
- Morga, B., Renault, T., Faury, N., Arzul, I., 2012. New insights in flat oyster *Ostrea edulis* resistance against the parasite *Bonamia ostreae*. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 958–68.
- Morga, B., Renault, T., Faury, N., Lerond, S., Garcia, C., Chollet, B., Joly, J.-P., Lapègue, S., Harrang, E., Arzul, I., 2017. Contribution of in Vivo Experimental Challenges to Understanding Flat Oyster *Ostrea edulis* Resistance to *Bonamia ostreae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 1–13.
- Morrison, J.F., 1973. Arginine Kinase and Other Invertebrate Guanidino Kinases. *Enzym.* 8, 457–486.
- Mosavi, L., Cammett, T., 2004. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* 13, 1435–1448.
- Mosquera, E., López, J.L., Alvarez, G., 2003. Genetic variability of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* assessed using two-dimensional electrophoresis. *Heredity (Edinb.)* 90, 432–442.

- Moulder, R., Filén, J.-J., Salmi, J., Katajamaa, M., Nevalainen, O.S., Oresic, M., Aittokallio, T., Lahesmaa, R., Nyman, T.A., 2005. A comparative evaluation of software for the analysis of liquid chromatography-tandem mass spectrometry data from isotope coded affinity tag experiments. *Proteomics* 5, 2748–2760.
- Mount, A.S., Wheeler, A.P., Paradkar, R.P., Snider, D., 2004. Hemocyte-mediated shell mineralization in the eastern oyster. *Science* 304, 297–300.
- Moynagh, P.N., 2005. The NF-kappaB pathway. *J. Cell Sci.* 118, 4589–4592.
- Mu, C., Yu, Y., Zhao, J., Wang, L., Song, X., Zhang, H., Qiu, L., Song, L., 2010. An inhibitor kappaB homologue from bay scallop *Argopecten irradians*. *Fish Shellfish Immunol* 28, 687–694.
- Mu, C., Chen, L., Zhao, J., Wang, C., 2014. Molecular cloning and expression of a C-type lectin gene from *Venerupis philippinarum*. *Mol. Biol. Rep.* 41, 139–144.
- Mueller, D.R., Voshol, H., Waldt, A., Wiedmann, B., Van Oostrum, J., 2007. LC-MALDI MS and MS/MS—an efficient tool in proteome analysis. *Subcell. Biochem.* 43, 355–80.
- Mukhopadhyay, S., Gordon, S., 2004. The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. *Immunobiology.*
- Müller, S., 2004. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Microbiol.*
- Mulloy, J.C., Cancelas, J.A., Filippi, M.-D., Kalfa, T.A., Guo, F., Zheng, Y., 2010. Rho GTPases in hematopoiesis and hemopathies. *Blood* 115, 936–947.
- Muñoz, P., Meseguer, J., Esteban, M.Á.A., 2006. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 12–19.
- Muralidharan, S., Thompson, E., Raftos, D., Birch, G., Haynes, P. a., 2012. Quantitative proteomics of heavy metal stress responses in Sydney rock oysters. *Proteomics* 12, 906–921.
- Myrnes, B., Nilsen, I.W., 2007. Glutathione S-transferase from the Icelandic scallop (*Chlamys islandica*): isolation and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 144, 403–7.
- Nabhan, J.F., El-Shehaby, F., Patocka, N., Ribeiro, P., 2007. The 26S proteasome in *Schistosoma mansoni*: bioinformatics analysis, developmental expression, and RNA interference (RNAi) studies. *Exp. Parasitol.* 117, 337–47.
- Naciri-Graven, Y., Martin, A.G., Baud, J.P., Renault, T., Gérard, A., 1998. Selecting the flat oyster *Ostrea edulis* (L.) for survival when infected with the parasite *Bonamia ostreae*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 224, 91–107.
- Naciri-Graven, Y., Haure, J., Gérard, A., Baud, J.P., 1999. Comparative growth of *Bonamia ostreae* resistant and wild flat oyster *Ostrea edulis* in an intensive system II. Second year of the experiment. *Aquaculture* 171, 195–208.
- Nakagawa, J., Waldner, H., Meyer-Monard, S., Hofsteenge, J., Jenö, P., Moroni, C., 1995. AUH, a gene encoding an AU-specific RNA binding protein with intrinsic enoyl-CoA hydratase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 2051–2055.
- Nakayama, K., Nomoto, A.M., Nishijima, M., Maruyama, T., 1997. Morphological and functional characterization of hemocytes in the giant clam, *Tridacna crocea*. *Dev. Comp. Immunol.*
- Nakayama, K., Maruyama, T., 1998. Differential production of active oxygen species in photo-symbiotic and non-symbiotic bivalves. *Dev. Comp. Immunol.* 22, 151–159.
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, a, Chandu, D., 2006. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci* 31, 137–155.
- Narain, A.S., 1973. The amoebocytes of lamellibranch molluscs, with special reference to the

- circulating amoebocytes. *Malacological Rev.* URL.
- Narcisi, V., Arzul, I., Cargini, D., Mosca, F., Calzetta, A., Traversa, D., Robert, M., Joly, J.P., Chollet, B., Renault, T., Tiscar, P.G., 2010. Detection of *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* (Haplosporidia) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). *Dis. Aquat. Organ.* 89, 79–85.
- Nell, J.A., Smith, R.I., McPhee, C.C., 2000. The Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould 1850) breeding programme: Progress and goals. *Aquac. Res.* 31, 45–49.
- Nelson, M.M., Jones, A.R., Carmen, J.C., Sinai, A.P., Burchmore, R., Wastling, J.M., 2008. Modulation of the host cell proteome by the intracellular apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 76, 828–844.
- Nemoto, Y., Arribas, M., Haffner, C., DeCamilli, P., 1997. Synaptojanin 2, a Novel Synaptojanin Isoform with a Distinct Targeting Domain and Expression Pattern. *J. Biol. Chem.* 272, 30817–30821.
- Nemoto, Y., De Camilli, P., 1999. Recruitment of an alternatively spliced form of synaptojanin 2 to mitochondria by the interaction with the PDZ domain of a mitochondrial outer membrane protein. *EMBO J.* 18, 2991–3006.
- Nesatyy, V.J., Suter, M.J.-F., 2008. Analysis of environmental stress response on the proteome level. *Mass Spectrom. Rev.* 27, 556–74.
- Nesic, O.B., Magoski, N.S., McKenney, K.K., Syed, N.I., Lukowiak, K., Bulloch, a G., 1996. Glutamate as a putative neurotransmitter in the mollusc, *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience* 75, 1255–69.
- Nesvizhskii, A.I., 2007. Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. *Methods Mol. Biol.* 367, 87–119.
- Newell, R.E., 1988. Ecological changes in Chesapeake Bay: Are they the result of overharvesting the American oyster, *Crassostrea virginica*, in: *Understanding the Estuary Advances in Chesapeake Bay Research*. Chesapeake Research Consortium, pp. 536–546.
- Newell, R.I.E., Cornwell, J.C., Owens, M.S., 2002. Influence of simulated bivalve biodeposition and microphytobenthos on sediment nitrogen dynamics: A laboratory study. *Limnol. Oceanogr.*
- Newell, R.I.E., 2004. Ecosystem influences of natural and cultivated populations of suspension-feeding bivalve molluscs: a review.
- Newell, R.I.E., Koch, E.W., 2004. Modeling seagrass density and distribution in response to changes in turbidity stemming from bivalve filtration and seagrass sediment stabilization. *Estuaries*.
- Newton, K., Peters, R., Raftos, D., 2004. Phenoloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Dev. Comp. Immunol.* 28, 565–569.
- Ni, D., Song, L., Wu, L., Chang, Y., Yu, Y., Qiu, L., Wang, L., 2007. Downregulation of the *Drosophila* immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 548–558.
- Nikapitiya, C., Dorrington, T., 2013. The role of histones in the immune responses of aquatic invertebrates 94–101.
- Noma, T., Murakami, R., Yamashiro, Y., Fujisawa, K., Inouye, S., Nakazawa, A., 2000. cDNA cloning and chromosomal mapping of the gene encoding adenylate kinase 2 from *Drosophila melanogaster*. *Biochim. Biophys. Acta* 1490, 109–14.
- Nonaka, M., Kimura, A., 2006. Genomic view of the evolution of the complement system. *Immunogenetics*.
- Nonaka, M., 2011. The complement C3 protein family in invertebrates. *ISJ-Invertebrate Surviv. J.* 8, 21–32.



- Normand, J., Li, R., Quillien, V., Nicolas, J.-L., Boudry, P., Pernet, F., Huvet, A., 2014. Contrasted survival under field or controlled conditions displays associations between mRNA levels of candidate genes and response to OsHV-1 infection in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Genomics* 15, 95–102.
- Novas, A., Cao, A., Barcia, R., Ramos-Martinez, J.I., 2004. Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 390–394.
- Núñez-Acuña, G., Aguilar-Espinoza, A., Chávez-Mardones, J., Gallardo-Escárate, C., 2012. Ubiquitin-conjugating enzyme E2-like gene associated to pathogen response in *Concholepas concholepas*: SNP identification and transcription expression. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 1065–1068.
- O'Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021.
- O'Neill, L.A., Bowie, A.G., 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 353–364.
- Ochieng, J., Chaudhuri, G., 2010. Cystatin superfamily. *J. Health Care Poor Underserved.*
- Odintsova, N.A., Maiorova, M.A., 2012. Localization of alphavbeta3-like integrin in cultivated larval cells of the mussel *Mytilus trossulus* during neuronal and muscle differentiation. *J. Mol. Histol.* 43, 449–459.
- Odo, S., Kamino, K., Kanai, S., Maruyama, T., Harayama, S., 1995. Biochemical characterization of a Ca(2+)-dependent lectin from the hemolymph of a photosymbiotic marine bivalve, *Tridacna derasa* (Röding). *J. Biochem.* 117, 965–73.
- Oladele, T.O., Bamigbola, O.M., Bewaji, C.O., 2009. On efficiency of sequence alignment algorithms. *African Sci.* 10, 9–14.
- Olafsen, J.A., 1995. Role of lectins (C-reactive protein) in defense of marine bivalves against bacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 371A, 343–348.
- Oliveira, D. V., Silva, T.S., Cordeiro, O.D., Cavaco, S.I., Simes, D.C., 2012. Identification of Proteins with Potential Osteogenic Activity Present in the Water-Soluble Matrix Proteins from *Crassostrea gigas* Nacre Using a Proteomic Approach. *Sci. World J.* 2012, 1–9.
- Olmstead, A.W., Leblanc, G. a., 2002. Juvenoid hormone methyl farnesoate is a sex determinant in the crustacean *Daphnia magna*. *J. Exp. Zool.* 293, 736–9.
- Olofsson, B., 1999. Rho guanine dissociation inhibitors: Pivotal molecules in cellular signalling. *Cell. Signal.*
- Olsen, Ø.M., Nilsen, I.W., Sletten, K., Myrnes, B., 2003. Multiple invertebrate lysozymes in blue mussel (*Mytilus edulis*). *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 136, 107–115.
- Olsen, J. V., Ong, S.-E., Mann, M., 2004. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol. Cell. Proteomics* 3, 608–614.
- Ong, S.T., Shan Ho, J.Z., Ho, B., Ding, J.L., 2006. Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology.*
- Ordás, M.C., Novoa, B., Figueras, A., 2000. Modulation of the chemiluminescence response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 611–22.
- Orlowski, M., Wilk, S., 2003. Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch. Biochem. Biophys.* 415, 1–5.
- Osmani, A.H., May, G.S., Osmani, S.A., 1999. The extremely conserved pyroA gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. *J. Biol. Chem.* 274, 23565–9.

- Ospelt, C., Gay, S., 2010. TLRs and chronic inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*
- Ottaviani, E., Franchini, A., Cassanelli, S., Genedani, S., 1995. Cytokines and invertebrate immune responses. *Biol. Cell* 85, 87–91.
- Ottaviani, E., Franchini, A., Franceschi, C., 1997. Pro-opiomelanocortin-derived peptides, cytokines, and nitric oxide in immune responses and stress: an evolutionary approach. *Int. Rev. Cytol.* 170, 79–141.
- Ottaviani, E., Franchini, A., Hanukoglu, I., 1998. In situ localization of ACTH receptor-like mRNA in molluscan and human immunocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 139–142.
- Ottaviani, E., Franchini, A., Malagoli, D., Genedani, S., 2000. Immunomodulation by recombinant human interleukin-8 and its signal transduction pathways in invertebrate hemocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 506–513.
- Ottaviani, E., Malagoli, D., Franchini, A., 2004. Invertebrate humoral factors: cytokines as mediators of cell survival. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 34, 1–25.
- Oubella, R., Maes, P., Allam, B., Paillard, C., Auffret, M., 1996. Selective induction of hemocytic response in *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia) by different species of *Vibrio* (Bacteria). *Aquat. Living Resour.* 9, 137–143.
- Oyanedel, D., Gonzalez, R., Brokordt, K., Schmitt, P., Mercado, L., 2016. Insight into the messenger role of reactive oxygen intermediates in immunostimulated hemocytes from the scallop *Argopecten purpuratus*. *Dev. Comp. Immunol.* 65, 226–230.
- Ozato, K., Shin, D.-M., Chang, T.-H., Morse, H.C., 2008. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 849–860.
- Ozsolak, F., Milos, P.M., 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat. Rev. Genet.* 12, 87–98.
- Paillard, C., Allam, B., Oubella, R., 2004. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis. Aquat. Organ.* 59, 249–262.
- Palagi, P.M., Hernandez, P., Walther, D., Appel, R.D., 2006. Proteome informatics I: Bioinformatics tools for processing experimental data. *Proteomics*.
- Pales Espinosa, E., Corre, E., Allam, B., 2014. Pallial mucus of the oyster *Crassostrea virginica* regulates the expression of putative virulence genes of its pathogen *Perkinsus marinus*. *Int. J. Parasitol.* 44, 305–17.
- Pallavicini, A., del Mar Costa, M., Gestal, C., Dreos, R., Figueras, A., Venier, P., Novoa, B., 2008. High sequence variability of myticin transcripts in hemocytes of immune-stimulated mussels suggests ancient host-pathogen interactions. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 213–226.
- Pålsson-McDermott, E.M., O'Neill, L.A.J., 2007. Building an immune system from nine domains. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1437–1444.
- Pandey, A., Mann, M., 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, 837–846.
- Papakonstanti, E.A., Stournaras, C., 2002. Association of PI-3 kinase with PAK1 leads to actin phosphorylation and cytoskeletal reorganization. *Mol. Biol. Cell* 13, 2946–2962.
- Pardo, B.G., Álvarez-Dios, J.A., Cao, A., Ramilo, A., Gómez-Tato, A., Planas, J. V., Villalba, A., Martínez, P., 2016. Construction of an *Ostrea edulis* database from genomic and expressed sequence tags (ESTs) obtained from *Bonamia ostreae* infected haemocytes: Development of an immune-enriched oligo-microarray. *Fish Shellfish Immunol.*
- Parisi, M.G., Li, H., Jouvett, L.B.P., Dyrynda, E. a., Parrinello, N., Cammarata, M., Roch, P., 2008. Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 834–840.
- Parisi, M.G., Toubiana, M., Mangano, V., Parrinello, N., Cammarata, M., Roch, P., 2012. MIF from mussel: coding sequence, phylogeny, polymorphism, 3D model and



- regulation of expression. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 688–96.
- Park, S.H., Kim, K.E., Hwang, H.Y., Kim, T.Y., 2003. Regulatory effect of SOCS on NF- $\kappa$ B activity in murine monocytes/macrophages. *DNA Cell Biol.* 22, 131–139.
- Park, K.I., Figueras, A., Choi, K.S., 2006. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the study of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): II. Impacts of *Perkinsus olseni* on clam reproduction. *Aquaculture* 251, 182–191.
- Park, E.M., Kim, Y.O., Nam, B.H., Kong, H.J., Kim, W.J., Lee, S.J., Kong, I.S., Choi, T.J., 2008. Cloning, characterization and expression analysis of the gene for a putative lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  factor of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* 24, 11–17.
- Passmore, L.A., Barford, D., 2004. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem. J.* 379, 513–525.
- Patrick, S., Faury, N., Goulletquer, P., 2006. Seasonal changes in carbohydrate metabolism and its relationship with summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Marennes–Oléron bay (France). *Aquaculture* 252, 328–338.
- Patton, W.F., 2000. A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis*.
- Pauletto, M., Segarra, A., Montagnani, C., Quillien, V., Faury, N., Le Grand, J., Miner, P., Petton, B., Labreuche, Y., Fleury, E., Fabioux, C., Bargelloni, L., Renault, T., Huvet, A., 2017. Long dsRNAs promote an anti-viral response in Pacific oyster hampering ostreid herpesvirus 1 replication. *J. Exp. Biol.* 220, 3671–3685.
- Pavlova, A., Björk, I., 2003. Grafting of features of cystatins C or B into the N-terminal region or second binding loop of cystatin A (stefin A) substantially enhances inhibition of cysteine proteinases. *Biochemistry*.
- Pawson, T., Nash, P., 2003. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science*.
- Paynter, K., Pierce, T., Burrenson, S.K., 1995. Free amino acid levels in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, infected with *Perkinsus marinus*. *Mar. Biol.* 62–72.
- Peng, J., Gygi, S.P., 2001. Proteomics: The move to mixtures. *J. Mass Spectrom.* 36, 1083–1091.
- Peng, X., 2013. Proteomics and its applications to aquaculture in China : Infection , immunity , and interaction of aquaculture hosts with pathogens. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 63–71.
- Perez-Hernandez, D., Gutiérrez-Vázquez, C., Jorge, I., López-Martín, S., Ursa, A., Sánchez-Madrid, F., Vázquez, J., Yáñez-Mó, M., 2013. The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *J. Biol. Chem.* 288, 11649–61.
- Perez-Torrado, R., Yamada, D., Defossez, P.A., 2006. Born to bind: The BTB protein-protein interaction domain. *BioEssays* 28, 1194–1202.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S., 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551–3567.
- Perkins, F.O., 1989. Phylum Haplosporidia. *Handb. Protoctista Margulis L, Corliss JO, Melkonian M, Chapman DJ (eds). Jones Bartlett Publ, Boston, EEUU* 19–29.
- Perrigault, M., Tanguy, A., Allam, B., 2009. Identification and expression of differentially expressed genes in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, in response to quahog parasite unknown (QPX). *BMC Genomics* 10, 377.
- Perrigault, M., Allam, B., 2012. Differential immune response in the hard clam (*Mercenaria mercenaria*) against bacteria and the protistan pathogen QPX (quahog parasite

- unknown). *Fish Shellfish Immunol.* 32, 1124–1134.
- Pertel, T., Hausmann, S., Morger, D., Züger, S., Guerra, J., Lascano, J., Reinhard, C., Santoni, F. a, Uchil, P.D., Chatel, L., Bisiaux, A., Albert, M.L., Strambio-De-Castillia, C., Mothes, W., Pizzato, M., Grütter, M.G., Luban, J., 2011. TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice. *Nature* 472, 361–365.
- Peters, R., Raftos, D.A., 2003. The role of phenoloxidase suppression in QX disease outbreaks among Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquaculture* 223, 29–39.
- Peterson, C.H., Grabowski, J.H., Powers, S.P., 2003. Estimated enhancement of fish production resulting from restoring oyster reef habitat: Quantitative valuation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*
- Peterson, C.H., Lipcius, R.N., 2003. Conceptual progress towards predicting quantitative ecosystem benefits of ecological restorations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*
- Philipp, E.E.R., Kraemer, L., Melzner, F., Poustka, A.J., Thieme, S., Findeisen, U., Schreiber, S., Rosenstiel, P., 2012. Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS One* 7, e33091.
- Piano, A., Asirelli, C., Caselli, F., Fabbri, E., 2002. Hsp70 expression in thermally stressed *Ostrea edulis*, a commercially important oyster in Europe. *Cell Stress Chaperones* 7, 250–257.
- Piano, A., Valbonesi, P., Fabbri, E., 2004. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell Stress Chaperones* 9, 134–142.
- Pichot, Y., Comps, M., Tigé, G., Grizel, H., Rabouin, M.A., 1980. Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau d l'huître plate *Ostrea edulis* L. *Rev. des Trav. l'Institut des Pêches Marit.* 43, 131–140.
- Picone, B., Rhode, C., Roodt-Wilding, R., 2015. Domain repeats related to innate immunity in the South African abalone, *Haliotis midae*. *Mar. Genomics* 23, 41–43.
- Pila, E.A., Sullivan, J.T., Wu, X.Z., Fang, J., Rudko, S.P., Gordy, M.A., Hanington, P.C., 2016. Haematopoiesis in molluscs: A review of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves. *Dev. Comp. Immunol.* 58, 119–128.
- Pipe, R.K., 1990. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.* 22, 595–603.
- Pipe, R.K., 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 111–122.
- Pipe, R.K., Farley, S.R., Coles, J.A., 1997. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell Tissue Res.* 289, 537–545.
- Pockley, G., 2003. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet* 362, 469–76.
- Polanco, E., Montes, J., Outon, M.J., Melendez, M.I., 1984. Pathological situation of the oysters' stock in Galicia (Spain) in relation to *Bonamia ostreae*., in: *Haliotis*. pp. 91–95.
- Pope, R., Mungre, S., Liu, H., Thimmapaya, B., 2000. Regulation of TNF-alpha expression in normal macrophages: the role of C/EBPbeta. *Cytokine*.
- Powis, G., Montfort, W.R., 2001. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 261–95.
- Prado-Alvarez, M., Gestal, C., Novoa, B., Figueras, A., 2009a. Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 72–83.
- Prado-Alvarez, M., Rotllant, J., Gestal, C., Novoa, B., Figueras, A., 2009b. Characterization

- of a C3 and a factor B-like in the carpet-shell clam, *Ruditapes decussatus*. Fish Shellfish Immunol. 26, 305–315.
- Prado-Alvarez, M., Romero, A., Balseiro, P., Dios, S., Novoa, B., Figueras, A., 2012. Morphological characterization and functional immune response of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) haemocytes after bacterial stimulation. Fish Shellfish Immunol. 32, 69–78.
- Prado-Alvarez, M., Chollet, B., Couraleau, Y., Morga, B., Arzul, I., 2013. Heat shock protein 90 of *Bonamia ostreae*: Characterization and possible correlation with infection of the flat oyster, *Ostrea edulis*. J. Eukaryot. Microbiol. 60, 257–266.
- Prado-Alvarez, M., Lynch, S.A., Kane, A., Darmody, G., Pardo, B.G., Martínez, P., Cotterill, J., Wontner-Smith, T., Culloty, S.C., 2015. Oral immunostimulation of the oyster *Ostrea edulis*: Impacts on the parasite *Bonamia ostreae*. Fish Shellfish Immunol. 45, 43–51.
- Prasad, S.V., Hapat, R., Kim, Y., 2014. Selectivity of a translation-inhibitory factor, CpBV15 $\beta$ , in host mRNAs and subsequent alterations in host development and immunity. Dev. Comp. Immunol. 44, 152–62.
- Pratt, W.B., Toft, D.O., 2003. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. Exp. Biol. Med. (Maywood). 228, 111–33.
- Price, P.W., 1980. Evolutionary biology of parasites. Monogr. Popul. Biol. 15, 1–237.
- Proestou, D.A., Vinyard, B.T., Corbett, R.J., Piesz, J., Allen, S.K., Small, J.M., Li, C., Liu, M., DeBrosse, G., Guo, X., Rawson, P., Gómez-Chiarri, M., 2016. Performance of selectively-bred lines of eastern oyster, *Crassostrea virginica*, across eastern US estuaries. Aquaculture 464, 17–27.
- Pruitt, K.D., Tatusova, T., Maglott, D.R., 2005. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. Nucleic Acids Res. 33, D501–4.
- Purchon, R.D., 1977. The Biology of the Mollusca, 2nd editio. ed. Oxford.
- Qamar, A., Golemi-Kotra, D., 2012. Dual roles of FmtA in *Staphylococcus aureus* cell wall biosynthesis and autolysis. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 3797–805.
- Qin, C.-L., Huang, W., Zhou, S.-Q., Wang, X.-C., Liu, H.-H., Fan, M.-H., Wang, R.-X., Gao, P., Liao, Z., 2014. Characterization of a novel antimicrobial peptide with chitin-binding domain from *Mytilus coruscus*. Fish Shellfish Immunol. 41, 362–370.
- Qiu, L., Song, L., Xu, W., Ni, D., Yu, Y., 2007. Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong Scallop, *Chlamys farreri*. Fish Shellfish Immunol. 22, 451–466.
- Qiu, L., Song, L., Yu, Y., Zhao, J., Wang, L., Zhang, Q., 2009. Identification and expression of TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) gene in Zhikong Scallop *Chlamys farreri*. Fish Shellfish Immunol. 26, 359–367.
- Rabilloud, T., 1998. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis.
- Rabilloud, T., 2002. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains, in: Proteomics. pp. 3–10.
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C., 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. J. Proteomics.
- Rabinovich, G.A., Gruppi, A., 2005. Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. Parasite Immunol. 27, 103–114.
- Raha, S., McEachern, G.E., Myint, A.T., Robinson, B.H., 2000. Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. Free Radic.

- Biol. Med. 29, 170–180.
- Rajendran, L., Masilamani, M., Solomon, S., Tikkanen, R., Stuermer, C.A.O., Plattner, H., Illges, H., 2003. Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8241–8246.
- Ralston, K.S., Kabututu, Z.P., Melchani, J.H., Oberholzer, M., Hill, K.L., 2009. The Trypanosoma brucei flagellum: moving parasites in new directions. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 335–362.
- Ram, J.L., Moore, D., Putchakayala, S., Paredes, A.A., Ma, D., Croll, R.P., 1999. Serotonergic responses of the siphons and adjacent mantle tissue of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 124, 211–220.
- Raman, J., Mehrotra, S., Anand, R.P., Balaram, H., 2004. Unique kinetic mechanism of *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138, 1–8.
- Ramilo, A., Navas, J.I., Villalba, A., Abollo, E., 2013. Species-specific diagnostic assays for *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* in European flat oyster *Ostrea edulis*: Conventional, real-time and multiplex PCR. *Dis. Aquat. Organ.* 104, 149–161.
- Ramilo, A., González, M., Carballal, M.J., Darriba, S., Abollo, E., Villalba, A., 2014. Oyster parasites *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* co-occur in Galicia (NW Spain): Spatial distribution and infection dynamics. *Dis. Aquat. Organ.* 110, 123–133.
- Randall, R.E., Goodbourn, S., 2008. Interferons and viruses: An interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.*
- Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W., Rhodes, C.P., 1985. Invertebrate Immunity: Basic Concepts and Recent Advances. *Int. Rev. Cytol.* 97, 183–350.
- Rathinam, A. V, Chen, T.T., Grossfeld, R.M., 2000. Cloning and sequence analysis of a cDNA for an inducible 70 kDa heat shock protein (Hsp70) of the American oyster (*Crassostrea virginica*). *DNA Seq.* 11, 261–264.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 205–18.
- Ray, M., Bhunia, N.S., Bhunia, A.S., Ray, S., 2013. A comparative analyses of morphological variations, phagocytosis and generation of cytotoxic agents in flow cytometrically isolated hemocytes of Indian molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 244–253.
- Raychaudhuri, S., Sinha, M., Mukhopadhyay, D., Bhattacharyya, N.P., 2007. HYPK, a Huntingtin interacting protein, reduces aggregates and apoptosis induced by N-terminal Huntingtin with 40 glutamines in Neuro2a cells and exhibits chaperone-like activity. *Hum. Mol. Genet.* 17, 240–255.
- Raza, H., John, A., 2006. 4-Hydroxynonenol induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis and expression of glutathione S-transferase A4-4 and cytochrome P450 2E1 in PC12 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 309–318.
- Rebelo, M. de F., Figueiredo, E. de S., Mariante, R.M., Nóbrega, A., de Barros, C.M., Allodi, S., 2013. New Insights from the Oyster *Crassostrea rhizophorae* on Bivalve Circulating Hemocytes. *PLoS One* 8.
- Reece, K.S., Siddall, M.E., Stokes, N.A., Bureson, E.M., 2004. Molecular phylogeny of the Haplosporidia based on two independent gene sequences. *J. Parasitol.* 90, 1111–22.
- Reeves, E.P., Nagl, M., Godovac-Zimmermann, J., Segal, A.W., 2003. Reassessment of the microbicidal activity of reactive oxygen species and hypochlorous acid with reference to the phagocytic vacuole of the neutrophil granulocyte. *J. Med. Microbiol.* 52, 643–51.
- Reitzer, L., 1996. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. *Escherichia coli Salmonella Cell.*
- Remaley, A.T., Kuhns, D.B., Basford, R.E., Glew, R.H., Kaplan, S.S., 1984. Leishmanial

- phosphatase blocks neutrophil O<sub>2</sub>- production. *J. Biol. Chem.* 259, 11173–11175.
- Renault, T., Cochenne, N., Grizel, H., 1995. *Bonamia ostreae*, parasite of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, does not experimentally infect the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 15, 78–80.
- Renault, T., Stokes, N.A., Chollet, B., Cochenne, N., Berthe, F., Gerard, A., Burreson, E.M., 2000. Haplosporidiosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the French Atlantic coast. *Dis. Aquat. Organ.* 42, 207–214.
- Renault, T., Xue, Q.G., Chilmonczyk, S., 2001. Flow cytometric analysis of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes using a monoclonal antibody specific for granulocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 269–74.
- Renault, T., Faury, N., Barbosa-Solomieu, V., Moreau, K., 2011. Suppression subtractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 725–735.
- Repnik, U., Turk, B., 2010. Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion.*
- Reth, M., 2002. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat. Immunol.* 3, 1129–34.
- Revathy, K.S., Umasuthan, N., Lee, Y., Whang, I., Kim, H.C., Lee, J., 2012. Cytosolic thioredoxin from *Ruditapes philippinarum*: Molecular cloning, characterization, expression and DNA protection activity of the recombinant protein. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 85–92.
- Richman, T.R., Davies, S.M.K., Shearwood, A.-M.J., Ermer, J. a, Scott, L.H., Hibbs, M.E., Rackham, O., Filipovska, A., 2014. A bifunctional protein regulates mitochondrial protein synthesis. *Nucleic Acids Res.* 42, 5483–5494.
- Ridley, A.J., 2001. Rho family proteins: Coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.*
- Rippon, S., 2000. *The Transformation of Coastal Wetlands: Exploitation and Management of Marshland Landscapes in North West Europe During the Roman and Medieval Periods.*
- Riva, C., Binelli, A., Rusconi, F., Colombo, G., Pedriali, A., Zippel, R., Provini, A., 2011. A proteomic study using zebra mussels (*D. polymorpha*) exposed to benzo(a)pyrene: the role of gender and exposure concentrations. *Aquat. Toxicol.* 104, 14–22.
- Rivero, A., 2006. Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends Parasitol.*
- Robert, R., Borel, M., Pichot, Y., Trut, G., 1991. Growth and mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquat. Living Resour.* 4, 265–274.
- Robert, J., 2003. Evolution of heat shock protein and immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 449–464.
- Roberts, S., Gueguen, Y., de Lorgeril, J., Goetz, F., 2008. Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1099–1104.
- Rodríguez-Lopez, J.N., Tudelap, J., Varons, R., Garcia-carmonap, F., Garcia-canovaspl, F., 1992. Analysis of a Kinetic Model for Melanin Biosynthesis Pathway. *J. Biol. Chem.* 267, 3801–3810.
- Rodríguez-Ortega, M.J., Grøsvik, B.E., Rodríguez-Ariza, A., Goksøyr, A., López-Barca, J., 2003. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. *Proteomics* 3, 1535–1543.
- Roger, E., Mitta, G., Moné, Y., Bouchut, A., Rognon, A., Grunau, C., Boissier, J., Théron, A., Gourbal, B.E.F., 2008. Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* model: new candidates identified by a



- global comparative proteomics approach. *Mol. Biochem. Parasitol.* 157, 205–16.
- Romero, A., Dios, S., Poisa-Beiro, L., Costa, M.M., Posada, D., Figueras, A., Novoa, B., 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.
- Ronzitti, G., Milandri, A., Scorticchini, G., Poletti, R., Rossini, G.P., 2008. Protein markers of algal toxin contamination in shellfish. *Toxicon* 52, 705–713.
- Roos, D., Van Bruggen, R., Meischl, C., 2003. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.*
- Röper, K., Gregory, S.L., Brown, N.H., 2002. The “spectraplakins”: cytoskeletal giants with characteristics of both spectrin and plakin families. *J. Cell Sci.* 115, 4215–25.
- Rosa, R.D., Santini, A., Fievet, J., Bulet, P., Destoumieux-Garzón, D., Bachère, E., 2011. Big defensins, a diverse family of antimicrobial peptides that follows different patterns of expression in hemocytes of the oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 6, e25594.
- Rosani, U., Varotto, L., Domeneghetti, S., Arcangeli, G., Pallavicini, A., Venier, P., 2015. Dual analysis of host and pathogen transcriptomes in ostreid herpesvirus 1-positive *Crassostrea gigas*. *Environ. Microbiol.* 17, 4200–4212.
- Rottner, K., Lommel, S., Wehland, J., Stradal, T.E.B., 2004. Pathogen-induced actin filament rearrangement in infectious diseases. *J. Pathol.*
- Royds, J. a, Iacopetta, B., 2006. P53 and Disease: When the Guardian Angel Fails. *Cell Death Differ.*
- Royet, J., Dziarski, R., 2007. Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 264–277.
- Rubenstein, P.A., 1990. The functional importance of multiple actin isoforms. *Bioessays* 12, 309–315.
- Ruddell, C.L., 1971. Elucidation of the nature and function of the granular oyster amoebocytes through histochemical studies of normal and traumatized oyster tissues. *Histochem. Cell Biol.* 26, 98–112.
- Ruesink, J.L., Lenihan, H.S., Trimble, A.C., Heiman, K.W., Micheli, F., Byers, J.E., Kay, M.C., 2005. Introduction of non-native oysters: Ecosystem Effects and Restoration Implications. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36, 643–689.
- Ruiz, C., Martínez, D., Mosquera, G., Abad, M., Sánchez, J.L., 1992. Seasonal variations in condition, reproductive activity and biochemical composition of the flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Mar. Biol.* 112, 67–74.
- Ruppert, E.E., Fox, R.S., Barnes, R.D., 2004. *Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach.* *Syst. Biol.* 53, 662–664.
- Russell-Pinto, F., Reimño, R., de Sousa, M., 1994. Haemocytes in *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia): distinct cell types engage in different responses to sheep erythrocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 383–397.
- Sakamoto, K., Toyohara, H., 2009. Molecular cloning of glycoside hydrolase family 45 cellulase genes from brackish water clam *Corbicula japonica*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 152, 390–396.
- Salin, M.L., McCord, J.M., 1975. Free radicals and inflammation. Protection of phagocytosine leukocytes by superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.* 56, 1319–23.
- Salvesen, G.S., Duckett, C.S., 2002. IAP proteins: blocking the road to death’s door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Sanchez, E.R., 2012. Chaperoning steroidal physiology: Lessons from mouse genetic models of Hsp90 and its cochaperones. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823, 722–

- 729.
- Sánchez-Marín, P., Fernández-González, L.E., Mantilla-Aldana, L., Diz, A.P., Beiras, R., 2017. Shotgun Proteomics Analysis Discards Alkali Labile Phosphate as a Reliable Method To Assess Vitellogenin Levels in *Mytilus galloprovincialis*. Environ. Sci. Technol. 51, 7572–7580.
- Santos, E.M., Ball, J.S., Williams, T.D., Wu, H., Ortega, F., Van Aerle, R., Katsiadaki, I., Falciani, F., Viant, M.R., Chipman, J.K., Tyler, C.R., 2010. Identifying health impacts of exposure to copper using transcriptomics and metabolomics in a fish model. Environ. Sci. Technol. 44, 820–826.
- Sarid, S., 1962. Proline iminopeptidase 237.
- Sato, M., Bremner, I., 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. Free Radic Biol Med.
- Sato, S., St-Pierre, C., Bhaumik, P., Nieminen, J., 2009. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble  $\beta$ -galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Immunol. Rev. 230, 172–187.
- Satterthwaite, A.B., Burn, T.C., Le Beau, M.M., Tenen, D.G., 1992. Structure of the gene encoding CD34, a human hematopoietic stem cell antigen. Genomics 12, 788–794.
- Savill, J., Fadok, V., 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature 407, 784–788.
- Schaumburg, F., Hippe, D., Vutova, P., Lüder, C.G.K., 2006. Pro- and anti-apoptotic activities of protozoan parasites. Parasitology 132 Suppl, S69-85.
- Schiffman, E.T., Nunn, B.L., Goodlett, D.R., Roberts, S.B., 2013. Shotgun proteomics as a viable approach for biological discovery in the Pacific oyster. Conserv. Physiol. 1, cot009-cot009.
- Schlenk, D., Buhler, D.R., 1989. Xenobiotic biotransformation in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.
- Schmidt, F., Donahoe, S., Hagens, K., Mattow, J., Schaible, U.E., Kaufmann, S.H.E., Aebersold, R., Jungblut, P.R., 2004. Complementary analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* proteome by two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tag technology. Mol. Cell. Proteomics 3, 24–42.
- Schmidt, F., Dahlmann, B., Janek, K., Kloß, A., Wacker, M., Ackermann, R., Thiede, B., Jungblut, P.R., 2006. Comprehensive quantitative proteome analysis of 20S proteasome subtypes from rat liver by isotope coded affinity tag and 2-D gel-based approaches. Proteomics 6, 4622–4632.
- Schmitt, P., Gueguen, Y., Desmarais, E., Bachère, E., de Lorgeril, J., 2010. Molecular diversity of antimicrobial effectors in the oyster *Crassostrea gigas*. BMC Evol. Biol. 10, 23.
- Schmitter, T., Agerer, F., Peterson, L., Munzner, P., Hauck, C.R., 2004. Granulocyte CEACAM3 is a phagocytic receptor of the innate immune system that mediates recognition and elimination of human-specific pathogens. J. Exp. Med. 199, 35–46.
- Schott, E.J., Pecher, W.T., Okafor, F., Vasta, G.R., 2003. The protistan parasite *Perkinsus marinus* is resistant to selected reactive oxygen species. Exp. Parasitol. 105, 232–240.
- Schrimpf, S.P., Weiss, M., Reiter, L., Ahrens, C.H., Jovanovic, M., Malmström, J., Brunner, E., Mohanty, S., Lercher, M.J., Hunziker, P.E., Aebersold, R., Von Mering, C., Hengartner, M.O., 2009. Comparative functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster* proteomes. PLoS Biol. 7, 0616–0627.
- Scotti, P.D., Dearing, S.C., Greenwood, D.R., Newcomb, R.D., 2001. Pernin: A novel, self-aggregating haemolymph protein from the New Zealand green-lipped mussel, *Perna canaliculus* (Bivalvia: Mytilidae). Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.



- 128, 767–779.
- Scotti, P.D., Dearing, S.C., Greenwood, D.R., 2007. Characterisation of cavortin, the major haemolymph protein of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 41, 91–101.
- Seastone, D.J., Zhang, L., Buczynski, G., Rebstein, P., Weeks, G., Spiegelman, G., Cardelli, J., 1999. The small Mr Ras-like GTPase Rap1 and the phospholipase C pathway act to regulate phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Biol. Cell* 10, 393–406.
- Segarra, A., Baillon, L., Tourbiez, D., Benabdelmouna, A., Faury, N., Bourgougnon, N., Renault, T., 2014. Ostreid herpesvirus type 1 replication and host response in adult Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Vet. Res.* 45, 30–32.
- Semenza, G.L., 2007. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. J.* 405, 1–9.
- Seo, J.K., Lee, M.J., Go, H.J., Kim, G. Do, Jeong, H. Do, Nam, B.H., Park, N.G., 2013. Purification and antimicrobial function of ubiquitin isolated from the gill of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mol. Immunol.* 53, 88–98.
- Serrato, R. V., 2014. Lipopolysaccharides in diazotrophic bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 119.
- Sharma, S., Singh, R., Rana, S., 2011. Review Article Bioactive Peptides: A Review. *Int.J.Bioautomation* 15, 223–250.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16.
- Shepard, J.L., Bradley, B.P., 2000. Protein expression signatures and lysosomal stability in *Mytilus edulis* exposed to graded copper concentrations, in: *Marine Environmental Research*. pp. 457–463.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.
- Shi, X., Li, X., Wang, S., Zhao, X., Wang, J., Wang, J., 2010. Transcriptome analysis of hemocytes and hepatopancreas in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, challenged with white spot syndrome virus. *Invertebr. Surviv. J.* 7, 119–131.
- Shi, X., Wang, L., Zhou, Z., Yang, C., Gao, Y., Wang, L., Song, L., 2012. The arginine kinase in Zhikong scallop *Chlamys farreri* is involved in immunomodulation. *Dev. Comp. Immunol.* 37, 270–8.
- Shi, X., Wang, L., Zhou, Z., Liu, R., Li, Y., Song, L., 2014. Acetylcholine modulates the immune response in Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol.* 38, 204–210.
- Shi, X., Zhou, Z., Wang, L., Wang, M., Shi, S., Wang, Z., Song, L., 2015. The immunomodulation of nicotinic acetylcholine receptor subunits in Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol.* 47, 611–22.
- Shoemaker, D.D., Linsley, P.S., 2002. Recent developments in DNA microarrays. *Curr. Opin. Microbiol.*
- Shpacovitch, V., Feld, M., Hollenberg, M.D., Luger, T.A., Steinhoff, M., 2008. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J. Leukoc. Biol.* 83, 1309–1322.
- Silberring, J., Ciborowski, P., 2010. Biomarker discovery and clinical proteomics. *TrAC - Trends Anal. Chem.*
- Silva Gunawardene, Y.I., Chow, B.K., He, J.G., Chan, S.M., 2001. The shrimp FAMEt cDNA is encoded for a putative enzyme involved in the methylfarnesoate (MF) biosynthetic pathway and is temporally expressed in the eyestalk of different sexes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 1115–24.

- Silva Gunawardene, Y.I.N., Bendena, W.G., Tobe, S.S., Chan, S.M., 2003. Comparative immunohistochemistry and cellular distribution of farnesoic acid O-methyltransferase in the shrimp and the crayfish. *Peptides* 24, 1591–1597.
- Simonian, M., Nair, S. V, Nell, J.A., Raftos, D.A., 2009a. Proteomic clues to the identification of QX disease-resistance biomarkers in selectively bred Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. *J. Proteomics* 73, 209–17.
- Simonian, M., Nair, S. V, O'Connor, W.A., Raftos, D.A., 2009b. Protein markers of *Marteilia sydneyi* infection in Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. *J. Fish Dis.* 32, 367–375.
- Siniscalchi, A., Cavallini, S., Sonetti, D., Sbrenna, G., Capuano, S., Barbin, L., Turolla, E., Rossi, R., 2004. Serotonergic neurotransmission in the bivalve *Venus verrucosa* (Veneridae): A neurochemical and immunohistochemical study of the visceral ganglion and gonads. *Mar. Biol.* 144, 1205–1212.
- Siwek, M., Slawinska, a., Rydzanicz, M., Wesoly, J., Fraszczak, M., Suchocki, T., Skiba, J., Skiba, K., Szyda, J., 2015. Identification of candidate genes and mutations in QTL regions for immune responses in chicken. *Anim. Genet.* n/a-n/a.
- Smith, L.C., Azumi, K., Nonaka, M., 1999. Complement systems in invertebrates. The ancient alternative and lectin pathways, in: *Immunopharmacology*.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.*
- Sokolova, I.M., 2009. Apoptosis in molluscan immune defense. *Invertebr. Surviv. J.* 6, 49–58.
- Soldatov, A.A., Gostiukhina, O.L., Golovina, I. V, 2007. Antioxidant enzyme complex of tissues of the bivalve *Mytilus galloprovincialis* Lam. under normal and oxidative-stress conditions: a review. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 43, 621–628.
- Sommer, G., Dittmann, J., Kuehnert, J., Reumann, K., Schwartz, P.E., Will, H., Coulter, B.L., Smith, M.T., Heise, T., 2011. The RNA-binding protein La contributes to cell proliferation and CCND1 expression. *Oncogene* 30, 434–44.
- Song, L., Wu, L., Ni, D., Chang, Y., Xu, W., Xing, K., 2006a. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. *Fish Shellfish Immunol.* 21, 335–345.
- Song, L., Xu, W., Li, C., Li, H., Wu, L., Xiang, J., Guo, X., 2006b. Development of expressed sequence tags from the bay scallop, *Argopecten irradians* irradians. *Mar. Biotechnol. (NY)*. 8, 161–9.
- Song, L., Wang, L., Qiu, L., Zhang, H., 2010. Bivalve immunity. Landes Bioscience and Springer Science Business Media.
- Soudant, P., Leite, R., Chu, F., Villalba, A., Cancela, L., 2008. Bivalves – Perkinsus spp . interactions. *Work. Anal. impact Perkinsosis to Eur. Shellfish Ind.* 1–42.
- Soudant, P., Chu, F.E., Volety, A., 2013. Host–parasite interactions : Marine bivalve molluscs and protozoan parasites, Perkinsus species. *J. Invertebr. Pathol.* 114, 196–216.
- Sperstad, S. V, Haug, T., Blencke, H.-M., Styrvold, O.B., Li, C., Stensvåg, K., 2011. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. *Biotechnol. Adv.* 29, 519–30.
- Staal, F.J.T., Luis, T.C., Tiemessen, M.M., 2008. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat. Rev. Immunol.*
- Stafford, S.L., Bokil, N.J., Achard, M.E.S., Kapetanovic, R., Schembri, M.A., McEwan, A.G., Sweet, M.J., 2013. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Biosci. Rep.*
- Standing, K., 2003. Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry. *Curr.*

- Opin. Struct. Biol.
- Stapley, J., Reger, J., Feulner, P.G.D., Smadja, C., Galindo, J., Ekblom, R., Bennison, C., Ball, A.D., Beckerman, A.P., Slate, J., 2010. Adaptation genomics: The next generation. *Trends Ecol. Evol.*
- Steen, H., Mann, M., 2004. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 699–711.
- Stefano, G.B., Leung, M.K., Zhao, X.H., Scharrer, B., 1989. Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 626–630.
- Steinberg, T.H., 2009. Protein gel staining methods: an introduction and overview. *Methods Enzymol.* 463, 541–563.
- Sternlicht, H., Farr, G.W., Sternlicht, M.L., Driscoll, J.K., Willisont, K., Yaffe, M.B., 1993. The t-complex polypeptide 1 complex is an in vivo chaperonin for tubulin 90, 9422–9426.
- Stewart, M.J., Favrel, P., Rotgans, B.A., Wang, T., Zhao, M., Sohail, M., O'Connor, W.A., Elizur, A., Henry, J., Cummins, S.F., 2014. Neuropeptides encoded by the genomes of the Akoya pearl oyster *Pinctata fucata* and Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a bioinformatic and peptidomic survey. *BMC Genomics* 15, 840.
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, a F., Glazer, a N., Ames, B.N., 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235, 1043–1046.
- Stockinger, W., 2006. Differential Requirements for Actin Polymerization, Calmodulin, and Ca<sup>2+</sup> Define Distinct Stages of Lysosome/Phagosome Targeting. *Mol. Biol. Cell* 17, 1697–1710.
- Stossel, T.P., Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J.H., Noegel, a, Schleicher, M., Shapiro, S.S., 2001. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Stout, R.D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S.K., Suttles, J., 2005. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J. Immunol.* 175, 342–349.
- Stults, J.T., Arnott, D., 2005. Proteomics. *Methods Enzymol.*
- Sturgill, T.W., Wu, J., 1991. Recent progress in characterization of protein kinase cascades for phosphorylation of ribosomal protein S6. *Biochim. Biophys. Acta* 1092, 350–7.
- Su, J., Qiu, L., Li, L., Liu, L., Wang, L., Siva, V.S., Yu, D., Song, L., 2011. cDNA cloning and characterization of a new member of the tumor necrosis factor receptor family gene from scallop, *Chlamys farreri*. *Mol. Biol. Rep.* 38, 4483–90.
- Suárez-Ulloa, V., Fernández-Tajes, J., Manfrin, C., Gerdol, M., Venier, P., Eirín-López, J.M., 2013. Bivalve omics: State of the art and potential applications for the biomonitoring of harmful marine compounds. *Mar. Drugs.*
- Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., Holle, A., 2003. A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 952–965.
- Sun, L., Huan, P., Wang, H., Liu, F., Liu, B., 2014. An EGFR gene of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* functions in wound healing and promotes cell proliferation. *Mol. Biol. Rep.* 41, 2757–2765.
- Sun, Y., Zhang, Y., Fu, X., Zhang, R., Zou, J., Wang, S., Hu, X., Zhang, L., Bao, Z., 2014. Identification of two secreted ferritin subunits involved in immune defense of Yesso scallop *Patinopecten yessoensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 37, 53–59.
- Sun, Z., Jiang, Q., Wang, L., Zhou, Z., Wang, M., Yi, Q., Song, L., 2014a. The comparative proteomics analysis revealed the modulation of inducible nitric oxide on the immune

- response of scallop *Chlamys farreri*. Fish Shellfish Immunol. 40, 584–594.
- Sun, Z., Yang, C., Wang, L., Wang, X., Wang, J., Yue, F., Liu, R., Zhang, H., Song, L., 2014b. The protein expression profile in hepatopancreas of scallop *Chlamys farreri* under heat stress and *Vibrio anguillarum* challenge. Fish Shellfish Immunol. 36, 252–60.
- Sunila, I., LaBanca, J., 2003. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Dis. Aquat. Organ. 56, 163–170.
- Sussarellu, R., Fabioux, C., Le Moullac, G., Fleury, E., Moraga, D., 2010. Transcriptomic response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hypoxia. Mar. Genomics 3, 133–143.
- Sussarellu, R., Huvet, A., Lapègue, S., Quillen, V., Lelong, C., Cornette, F., Jensen, L.F., Bierre, N., Boudry, P., 2015. Additive transcriptomic variation associated with reproductive traits suggest local adaptation in a recently settled population of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. BMC Genomics 1–12.
- Suzuki, T., Yoshinaka, R., Mizuta, S., Funakoshi, S., Wada, K., 1991. Extracellular matrix formation by amoebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster *Pinctada fucata*. Cell Tissue Res. 266, 75–82.
- Suzuki, Y., Takahashi-Niki, K., Akagi, T., Hashikawa, T., Takahashi, R., 2004. Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways. Cell Death Differ. 11, 208–216.
- Sweet, M.J., Hume, D.A., 1996. Endotoxin signal transduction in macrophages. J. Leukoc. Biol. 60, 8–26.
- Syka, J.E.P., Coon, J.J., Schroeder, M.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., 2004. Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 9528–9533.
- Szegedi, S.S., Castro, C.C., Koutmos, M., Garrow, T.A., 2008. Betaine-Homocysteine S-Methyltransferase-2 Is an S-Methylmethionine-Homocysteine Methyltransferase. J. Biol. Chem. 283, 8939–8945.
- Tabb, D.L., MacCoss, M.J., Wu, C.C., Anderson, S.D., Yates, J.R., 2003a. Similarity among tandem mass spectra from proteomic experiments: Detection, significance, and utility. Anal. Chem. 75, 2470–2477.
- Tabb, D.L., Saraf, A., Yates, J.R., 2003b. GutenTag: High-Throughput Sequence Tagging via an Empirically Derived Fragmentation Model. Anal. Chem. 75, 6415–6421.
- Tafalla, C., Gómez-León, J., Novoa, B., Figueras, A., 2003. Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. Dev. Comp. Immunol. 27, 197–205.
- Taguchi, T., T, O., S, I., Y, I., Y, S., H, K., N, T., 2000. Purification and characterization of UDP-GlcNAc: glcNAc1-6(GlcNAc1-2) Mana1-R [GlcNAc to Man]-b1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase VI from hen oviduct. J Biol Chem 32598–32602.
- Takada, A., Takada, Y., Urano, T., 1994. The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. Thromb. Res. 1–31.
- Takada, Y., Mukhopadhyay, A., Kundu, G.C., Mahabeleshwar, G.H., Singh, S., Aggarwal, B.B., 2003. Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. J. Biol. Chem. 278, 24233–41.
- Takahashi, K.G., Kuroda, T., Muroga, K., 2008. Purification and antibacterial characterization of a novel isoform of the Manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 150, 45–52.
- Tambor, V., Fučíková, A., Lenčo, J., Kacerovský, M., Řeháček, V., Stulík, J., Pudil, R., 2010.

- Application of proteomics in biomarker discovery: A primer for the clinician. *Physiol. Res.* 59, 471–497.
- Tanabe, T., Osada, M., Kyozuka, K., Inaba, K., Kijima, A., 2006. A novel oocyte maturation arresting factor in the central nervous system of scallops inhibits serotonin-induced oocyte maturation and spawning of bivalve mollusks. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 352–361.
- Tanaka, T., Hosoi, F., Yamaguchi-Iwai, Y., Nakamura, H., Masutani, H., Ueda, S., Nishiyama, A., Takeda, S., Wada, H., Spyrou, G., Yodoi, J., 2002. Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *EMBO J.* 21, 1695–1703.
- Tanguy, A., Guo, X., Ford, S.E., 2004. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* 338, 121–131.
- Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J., Moraga, D., 2005a. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS J.* 272, 390–403.
- Tanguy, A., Boutet, I., Moraga, D., 2005b. Molecular characterization of the glutamine synthetase gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: expression study in response to xenobiotic exposure and developmental stage. *Biochim. Biophys. Acta* 1681, 116–25.
- Tanguy, M., McKenna, P., Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Danger, J.-M., Siah, A., 2013. Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria, *Vibrio splendidus*. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 419–29.
- Taris, N., Lang, R.P., Reno, P.W., Camara, M.D., 2009. Transcriptome response of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) to infection with *Vibrio tubiashii* using cDNA AFLP differential display. *Anim. Genet.* 40, 663–677.
- Tasumi, S., Vasta, G.R., 2007. A galectin of unique domain organization from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. *J. Immunol.* 179, 3086–3098.
- Tate, S.S., Leu, F.Y., Meister, A., 1972. Rat liver glutamine synthetase. Preparation, properties, and mechanism of inhibition by carbamyl phosphate. *J. Biol. Chem.* 247, 5312–21.
- Tchórzewski, M., 2002. The acidic ribosomal P proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 911–915.
- Technau, U., Rudd, S., Maxwell, P., Gordon, P.M.K., Saina, M., Grasso, L.C., Hayward, D.C., Sensen, C.W., Saint, R., Holstein, T.W., Ball, E.E., Miller, D.J., 2005. Maintenance of ancestral complexity and non-metazoan genes in two basal cnidarians. *Trends Genet.* 21, 633–639.
- Terahara, K., Takahashi, K.G., Nakamura, A., Osada, M., Yoda, M., Hiroi, T., Hirasawa, M., Mori, K., 2006. Differences in integrin-dependent phagocytosis among three hemocyte subpopulations of the Pacific oyster “*Crassostrea gigas*.” *Dev. Comp. Immunol.* 30, 667–683.
- Terahara, K., Takahashi, K.G., 2008. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. *Curr. Pharm. Des.* 14, 131–7.
- Thayer, G.W., Stuart, H.H., Kenworthy, W.J., Ustach, J.F., Hall, A.B., 1978. Habitat values of salt marshes, mangroves, and seagrasses for aquatic organisms. *Wetl. Funct. Values State Our Understanding.* *Am. Water Resour. Assoc.* 235–247.
- Therrien, M., Wong, A.M., Kwan, E., Rubin, G.M., 1999. Functional analysis of CNK in RAS signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 13259–63.
- Thiede, B., Höhenwarter, W., Kraha, A., Mattow, J., Schmid, M., Schmidt, F., Jungblut, P.R.,



2005. Peptide mass fingerprinting. *Methods* 35, 237–247.
- Thomas-Guyon, H., Gagnaire, B., Bado-Nilles, A., Bouilly, K., Lapègue, S., Renault, T., 2009. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Dev. Comp. Immunol.* 33, 653–659.
- Thomas, J.H., 2006. Adaptive evolution in two large families of ubiquitin-ligase adapters in nematodes and plants. *Genome Res.* 16, 1017–1030.
- Thompson, A.J. V, Locarnini, S. A., 2007. Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunol. Cell Biol.* 85, 435–45.
- Thompson, E.L., Taylor, D.A., Nair, S. V, Birch, G., Haynes, P., Raftos, D.A., 2012. Proteomic discovery of biomarkers of metal contamination in Sydney Rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Aquat. Toxicol.* 109, 202–12.
- Thompson, E.L., O'Connor, W., Parker, L., Ross, P., Raftos, D.A., 2015. Differential proteomic responses of selectively bred and wild-type Sydney rock oyster populations exposed to elevated CO<sub>2</sub>. *Mol. Ecol.* 1248–1262.
- Tigé, G., Grizel, H., Rabouin, M.A., Cochenne, N., Audc, G., Langlade, A., 1982. Maladie hémogtaire de l'huître plate causée par *Bonamia ostreae*: evolution de la situation épizootiologique en Bretagne au cours de l'année 1981. *Sci. Pêche* 328, 3–13.
- Tigé, G., Grizel, H., 1984. Essai de contamination d'*Ostrea edulis* Linne par *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1979) en rivière de Crach (Morbinhan). *Rev. des Trav. l'Institut des Pêches Marit.* 46, 307–314.
- Timmins-Schiffman, E., Coffey, W.D., Hua, W., Nunn, B.L., Dickinson, G.H., Roberts, S.B., 2014. Shotgun proteomics reveals physiological response to ocean acidification in *Crassostrea gigas*. *Conserv. Physiol.* 1, 1–59.
- Tiscar, P.G., Mosca, F., 2004. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Vet. Res. Commun.* 28 Suppl 1, 57–62.
- Todgham, A.E., Hofmann, G.E., 2009. Transcriptomic response of sea urchin larvae *Strongylocentrotus purpuratus* to CO<sub>2</sub>-driven seawater acidification. *J. Exp. Biol.* 212, 2579–2594.
- Tokumoto, M., Fujiwara, Y., Shimada, A., Hasegawa, T., Seko, Y., Nagase, H., Satoh, M., 2011. Cadmium toxicity is caused by accumulation of p53 through the down-regulation of Ube2d family genes in vitro and in vivo. *J. Toxicol. Sci.* 36, 191–200.
- Tolley, S., Volety, A., 2005. The role of oysters in habitat use of oyster reefs by resident fishes and decapod crustaceans. *J. Shellfish Res.* 24, 1007–1012.
- Tomanek, L., Zuzow, M.J., 2010. The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress. *J. Exp. Biol.* 213, 3559–74.
- Tomanek, L., 2011. Environmental proteomics: changes in the proteome of marine organisms in response to environmental stress, pollutants, infection, symbiosis, and development. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 3, 373–99.
- Tomanek, L., Zuzow, M.J., Ivanina, A. V, Beniash, E., Sokolova, I.M., 2011. Proteomic response to elevated PCO<sub>2</sub> level in eastern oysters, *Crassostrea virginica*: evidence for oxidative stress. *J. Exp. Biol.* 214, 1836–1844.
- Tomanek, L., 2012. Environmental proteomics of the mussel *Mytilus*: implications for tolerance to stress and change in limits of biogeographic ranges in response to climate change. *Integr. Comp. Biol.* 52, 648–64.
- Tomanek, L., 2014. Proteomics to study adaptations in marine organisms to environmental stress. *J. Proteomics* 105, 92–106.
- Tomme, P., Warren, R.A.J., Gilkes, N.R., 1995. Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi. pp. 1–81.

- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I., Davison, M., 2001. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1, 377–396.
- Torreilles, J., Guérin, M.-C., Roch, P., 1999. Modified Alsever's solution is not a good medium for reactive oxygen metabolite study in bivalves. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 65–69.
- Toubiana, M., Rosani, U., Giambelluca, S., Cammarata, M., Gerdol, M., Pallavicini, A., Venier, P., Roch, P., 2014. Toll signal transduction pathway in bivalves: Complete cds of intermediate elements and related gene transcription levels in hemocytes of immune stimulated *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Comp. Immunol.* 45, 300–312.
- Travers, M.A., Mirella da Silva, P., Le Goïc, N., Marie, D., Donval, A., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 400–411.
- Truebano, M., Diz, A.P., Thorne, M. a. S., Clark, M.S., Skibinski, D.O.F., 2013. Proteome response to heat stress in the Antarctic clam *Laternula elliptica*. *J. Integr. OMICS* 3, 34–43.
- Tsan, M.-F., Gao, B., 2009. Heat shock proteins and immune system. *J. Leukoc. Biol.* 85, 905–10.
- Tschopp, J., Masson, D., Stanley, K.K., 1986. Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytolysis. *Nature* 322, 831–4.
- Tunkijjanukij, S., Olafsen, J. a., 1998. Sialic acid-binding lectin with antibacterial activity from the horse mussel: further characterization and immunolocalization. *Dev. Comp. Immunol.* 22, 139–50.
- Turk, V., Bode, W., 1991. The cystatins: Protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.*
- Twilley, R.R., Kempl, W.M., Staverl, K.W., Stevensonl, J.C., Boynton, W.R., 1985. Nutrient enrichment of estuarine submersed vascular plant communities. Algal growth and effects on production of plants and associated communities. *Mar. Ecol.*
- Tyrer, P., Foxwell, A.R., Cripps, A.W., Apicella, M.A., Kyd, J.M., 2006. Microbial pattern recognition receptors mediate M-cell uptake of a gram-negative bacterium. *Infect. Immun.* 74, 625–631.
- Uda, K., Fujimoto, N., Akiyama, Y., Mizuta, K., Tanaka, K., Ellington, W.R., Suzuki, T., 2006. Evolution of the arginine kinase gene family. *Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics* 1, 209–18.
- Ulevitch, R.J., Tobias, P.S., 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 437–457.
- Umasuthan, N., Revathy, K.S., Lee, Y., Whang, I., Lee, J., 2012. Mitochondrial thioredoxin-2 from Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) is a potent antioxidant enzyme involved in antibacterial response. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 513–23.
- Valavanis, C., Wang, Z., Sun, D., Vaine, M., Schwartz, L.M., 2007. Acheron, a novel member of the Lupus Antigen family, is induced during the programmed cell death of skeletal muscles in the moth *Manduca sexta*. *Gene* 393, 101–9.
- Valentijn, K., Valentijn, J.A., Jamieson, J.D., 1999. Role of Actin in Regulated Exocytosis and Compensatory Membrane Retrieval: Insights from an Old Acquaintance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266, 652–661.
- van Banning, P., 1977. *Minchinia armoricana* sp. nov. (Haplosporida), a parasite of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *J. Invertebr. Pathol.*



- van Banning, P., 1985. Control of *Bonamia* in dutch oyster culture. *Fish Shellfish Pathol.* 42, 393–396.
- van Banning, P., 1987. Further results of the *Bonamia ostreae* challenge tests in Dutch oyster culture. *Aquaculture* 67, 191–194.
- van Banning, P., 1988. Management strategies to control disease in the Dutch culture of edible oysters, *Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs*. American Fisheries Society.
- van Banning, P., 1991. Observations on bonamiosis in the stock of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Netherlands, with special reference to the recent developments in Lake Grevelingen. *Aquaculture* 93, 205–211.
- Van Den Eijnden, D.H., Winterwerp, H., Smeeman, P., Schiphorst, W.E., 1983. Novikoff ascites tumor cells contain N-acetylglucosaminidase beta 1 leads to 3 and beta 1 leads to 6 N-acetylglucosaminyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* 258, 3435–7.
- Van den Heuvel, R.H.H., Curti, B., Vanoni, M. a, Mattevi, A., 2004. Glutamate synthase: a fascinating pathway from L-glutamine to L-glutamate. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 669–81.
- van Horssen, R., Janssen, E., Peters, W., van de Pasch, L., Lindert, M.M. Te, van Dommelen, M.M.T., Linssen, P.C., Hagen, T.L.M. Ten, Franssen, J.A.M., Wieringa, B., 2009. Modulation of cell motility by spatial repositioning of enzymatic ATP/ADP exchange capacity. *J. Biol. Chem.* 284, 1620–7.
- Van Rensburg, M.J., Coyne, V.E., 2009. The role of electron transport in the defence response of the South African abalone, *Haliotis midae*. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 171–6.
- Vandermoere, F., El Yazidi-Belkoura, L., Demont, Y., Slomianny, C., Antol, J., Lemoine, J., Hondermarck, H., 2007. Proteomics exploration reveals that actin is a signaling target of the kinase Akt. *Mol. Cell. Proteomics* 6, 114–124.
- Vanoni, M. a, Curti, B., 1999. Glutamate synthase: a complex iron-sulfur flavoprotein. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 617–38.
- Vasemägi, A., Primmer, C.R., 2005. Challenges for identifying functionally important genetic variation: The promise of combining complementary research strategies. *Mol. Ecol.*
- Vásquez-Yeomans, R., Cáceres-Martínez, J., 2007. Mecanismos de defensa en moluscos bivalvos: respuesta celular. *Boletín del Programa Nac. Sanid. Acuicola y la Red Diagnóstico, UAM – SAGARPA* 39, 4–6.
- Vasselon, T., 2002. Toll Receptors: a Central Element in Innate Immune Responses. *Infect. Immun.* 70, 1033–1041.
- Vasta, G.R., Quesenberry, M., Ahmed, H., O’Leary, N., 1999. C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: Their roles in the complement activation pathway. *Dev. Comp. Immunol.*
- Vasta, G.R., Cheng, T.C., Marchalonis, J.J., 1984. A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). *Cell. Immunol.* 88, 475–488.
- Vasta, G.R., 2009. Roles of galectins in infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 424–38.
- Vaux, D.L., Korsmeyer, S.J., 1999. Cell death in development. *Cell.*
- Veldhuizen-Tsoerkan, M.B., Holwerda, D.A., Van der Mast, C.A., Zandee, D.I., 1991. Synthesis of stress proteins under normal and heat shock conditions in gill tissue of sea mussels (*Mytilus edulis*) after chronic exposure to cadmium. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 100, 699–706.
- Venier, P., Varotto, L., Rosani, U., Millino, C., Celegato, B., Bernante, F., Lanfranchi, G., Novoa, B., Roch, P., Figueras, A., Pallavicini, A., 2011. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics* 12, 69.
- Vera, M., Carlsson, J., Carlsson, J. El, Cross, T., Lynch, S., Kamermans, P., Villalba, A.,

- Culloty, S., Martínez, P., 2016. Current genetic status, temporal stability and structure of the remnant wild European flat oyster populations: conservation and restoring implications. *Mar. Biol.* 163, 1–17.
- Vergote, D., Bouchut, A., Sautière, P.E., Roger, E., Galinier, R., Rognon, A., Coustau, C., Salzet, M., Mitta, G., 2005. Characterisation of proteins differentially present in the plasma of *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to *Echinostoma caproni*. *Int. J. Parasitol.* 35, 215–224.
- Vieira, G.C., da Silva, P.M., Barracco, M.A., Hering, A.F., Albuquerque, M.C.P. de, Coelho, J. da R., Schmidt, É.C., Bouzon, Z.L., Rosa, R.D., Perazzolo, L.M., 2017. Morphological and functional characterization of the hemocytes from the pearl oyster *Pteria hirundo* and their immune responses against *Vibrio infections*. *Fish Shellfish Immunol.* 70, 750–758.
- Villalba, A., da Silva, P.M., Fuentes, J., 2007. La producción de estirpes de *Ostrea edulis* tolerantes a la bonamiosis como solución para el engorde de la ostra plana en Galicia, in: XI Congreso Nacional de Acuicultura. pp. 1499–1504.
- Villalba, A., Ramilo, A., Abollo, E., Fuentes, J., 2010. Mass mortality of European flat oyster *Ostrea edulis* spat associated with a viral infection in Galicia (NW Spain). *Aquac. Eur.* 10, 1380–1381.
- Villalba, A., Figueras, A., 2011. Estrategias de lucha frente a enfermedades de moluscos bivalvos. Enfermedades de Moluscos bivalvos de interés en acuicultura. Publicaciones científicas y tecnológicas la Fund. Obs. Español Acuic.
- Villamil, L., Gómez-León, J., Gómez-Chiarri, M., 2007. Role of nitric oxide in the defenses of *Crassostrea virginica* to experimental infection with the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 968–77.
- Virvilis, C., Angelidis, P., Photis, G., 2003. Presence of the parasite *Marteilia* sp. in the shellfish of the Thermaikos gulf in northern Greece. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 23, 157–162.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.J., Valavanidis, A., 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1361–1371.
- Voges, D., Zwickl, P., Baumeister, W., 1999. The 26S Proteasome: a molecular machine designed for controlled. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 1015–1068.
- Volety, A.K., Chu, F.L.E., 1995. Suppression of chemiluminescence of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) hemocytes by the protozoan parasite *Perkinsus marinus*. *Dev. Comp. Immunol.* 19, 135–142.
- von Knethen, A., Tautenhahn, A., Link, H., Lindemann, D., Brüne, B., 2005. Activation-induced depletion of protein kinase C alpha provokes desensitization of monocytes/macrophages in sepsis. *J. Immunol.* 174, 4960–5.
- Wäge, J., Lerebours, A., Hardege, J.D., Rotchell, J.M., 2016. Exposure to low pH induces molecular level changes in the marine worm, *Platynereis dumerilii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 124, 105–110.
- Walne, P.R., 1964. Observations on the Fertility of the Oyster (*Ostrea edulis*). *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 44, 293.
- Walsh, C.M., Edinger, A.L., 2010. The complex interplay between autophagy, apoptosis, and necrotic signals promotes T-cell homeostasis. *Immunol. Rev.*
- Walsh, C.T., Garneau-Tsodikova, S., Gatto, G.J., 2005. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44, 7342–72.
- Wang, D.-Z., Li, C., Xie, Z.-X., Dong, H.-P., Lin, L., Hong, H.-S., 2011. Homology-Driven

- Proteomics of Dinoflagellates with Unsequenced Genomes Using MALDI-TOF/TOF and Automated De Novo Sequencing. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2011, 471020.
- Wang, D., Dong, H., Li, C., Xie, Z., Lin, L., Hong, H., 2011. Identification and Characterization of Cell Wall Proteins of a Toxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella* Using 2-D DIGE and MALDI TOF-TOF Mass Spectrometry. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*
- Wang, G.D., Zhang, K.F., Zhang, Z.P., Zou, Z.H., Jia, X.W., Wang, S.H., Lin, P., Wang, Y.L., 2008. Molecular cloning and responsive expression of macrophage expressed gene from small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 346–359.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Ruc, E.A., Semenza, G.L., 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5510–5514.
- Wang, H.C., Wang, H.-C., Leu, J.-H., Kou, G.-H., Wang, A.H.-J., Lo, C.-F., 2007. Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 672–686.
- Wang, H., Song, L.S., Li, C.H., Zhao, J.M., Zhang, H., Ni, D.J., Xu, W., 2007. Cloning and characterization of a novel C-type lectin from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Mol. Immunol.* 44, 722–731.
- Wang, J.Q., Jeelall, Y.S., Ferguson, L.L., Horikawa, K., 2014. Toll-like receptors and cancer: MYD88 mutation and inflammation. *Front. Immunol.* 5, 1–10.
- Wang, K.-J., Ren, H.-L., Xu, D.-D., Cai, L., Yang, M., 2008. Identification of the up-regulated expression genes in hemocytes of variously colored abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve, 1846) challenged with bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1326–47.
- Wang, K., del Castillo, C., Corre, E., Pales Espinosa, E., Allam, B., 2016. Clam focal and systemic immune responses to QPX infection revealed by RNA-seq technology. *BMC Genomics* 17, 146.
- Wang, L., Weber, A.N.R., Atilano, M.L., Filipe, S.R., Gay, N.J., Ligoxygakis, P., 2006. Sensing of Gram-positive bacteria in *Drosophila*: GNBPI is needed to process and present peptidoglycan to PGRP-SA. *EMBO J.* 25, 5005–5014.
- Wang, L., Song, L., Ni, D., Zhang, H., Liu, W., 2009a. Alteration of metallothionein mRNA in bay scallop *Argopecten irradians* under cadmium exposure and bacteria challenge. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 149, 50–57.
- Wang, L., Song, L., Zhao, J., Qiu, L., Zhang, H., Xu, W., Li, H., Li, C., Wu, L., Guo, X., 2009b. Expressed sequence tags from the zhikong scallop (*Chlamys farreri*): discovery and annotation of host-defense genes. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 744–50.
- Wang, L., Song, X., Song, L., 2018. The oyster immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 80, 99–118.
- Wang, Q., Zhang, L., Zhao, J., You, L., Wu, H., 2012. Two Goose-Type Lysozymes in *Mytilus galloprovincialis*: Possible Function Diversification and Adaptive Evolution. *PLoS One* 7.
- Wang, S., Peatman, E., Liu, H., Bushek, D., Ford, S.E., Kucuktas, H., Quilang, J., Li, P., Wallace, R., Wang, Y., Guo, X., Liu, Z., 2010. Microarray analysis of gene expression in eastern oyster (*Crassostrea virginica*) reveals a novel combination of antimicrobial and oxidative stress host responses after dermo (*Perkinsus marinus*) challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 921–9.
- Wang, W., Li, M., Wang, L., Chen, H., Liu, Z., Jia, Z., Qiu, L., Song, L., 2017. The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*. *Dev.*

- Comp. Immunol. 67, 221–228.
- Wang, X., Patel, R., Studzinski, G.P., 2008. hKSR-2, a vitamin D-regulated gene, inhibits apoptosis in arabinocytosine-treated HL60 leukemia cells. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2798–806.
- Wang, X., Wang, L., Yao, C., Qiu, L., Zhang, H., Zhi, Z., Song, L., 2012a. Alternation of immune parameters and cellular energy allocation of *Chlamys farreri* under ammonia-N exposure and *Vibrio anguillarum* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 741–749.
- Wang, X., Wang, L.L., Zhang, H., Ji, Q., Song, L., Qiu, L., Zhou, Z., Wang, M., Wang, L.L., 2012b. Immune response and energy metabolism of *Chlamys farreri* under *Vibrio anguillarum* challenge and high temperature exposure. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 1016–26.
- Wang, X., Wang, L., Zhang, H., Liu, R., Song, L., 2014. The carbohydrate metabolism of scallop *Chlamys farreri* in the immune response against acute challenge of *Vibrio anguillarum*. *Aquac. Int.*
- Wang, Y., Fu, D., Luo, P., He, X., 2012. Identification of the immune expressed sequence tags of pearl oyster (*Pinctada martensii*, Dunker 1850) responding to *Vibrio alginolyticus* challenge by suppression subtractive hybridization. *Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics* 7, 243–7.
- Wang, Z., Wu, Z., Jian, J., Lu, Y., 2008. Cloning and expression of an actin gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850). *Mar. Genomics* 1, 63–7.
- Ward, J.E., Newell, R.I.E., Thompson, R.J., Macdonald, B.A., 1994. In-vivo studies of suspension-feeding processes in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Biol. Bull.* 186, 221–240.
- Washburn, M.P., Wolters, D., Yates, J.R., 2001. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* 19, 242–247.
- Wasserman, S., 1998. FH proteins as cytoskeletal organizers. *Trends Cell Biol.*
- Watanabe, H., Tokuda, G., 2001. Animal cellulases. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1167–1178.
- Wei, X., Yang, J.J., Yang, D., Xu, J., Liu, X., Yang, J.J., Fang, J., Qiao, H., 2012. Molecular cloning and mRNA expression of two peptidoglycan recognition protein (PGRP) genes from mollusk *Solen grandis*. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 178–185.
- Weiss, M., Fischer, G., Barth, E., Boneberg, E., Schneider, E.M., Georgieff, M., Hartung, T., 2001. Dissociation of LPS-induced monocytic ex vivo production of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and TNF-alpha in patients with septic shock. *Cytokine* 13, 51–54.
- Wells, H.W., 1961. The Fauna of Oyster Beds, with Special Reference to the Salinity Factor. *Ecol. Monogr.* 31, 239.
- Wells, A., 1999. EGF receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 637–43.
- Whisstock, J.C., Wiradjaja, F., Waters, J.E., Gurung, R., 2002. The structure and function of catalytic domains within inositol polyphosphate 5-phosphatases. *IUBMB Life* 53, 15–23.
- Whittaker, C.A., Hynes, R.O., 2002. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol. Biol. Cell* 13, 3369–87.
- Whittle, M.A., Gabbott, P.A., 1986. Glycogen synthetase in the sea mussel, *Mytilus edulis* L.—III. Regulation by glucose in a mantle tissue slice preparation. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.*
- Wiacek, M., Uddin, N., Kim, H., Zubrzycki, I.Z., 2013. Proteome Changes in Response to Ecologically Viable Environmental Variation in *Calanus sinicus* 78–87.
- Wickramarachchi, D.C., Theofilopoulos, A.N., Kono, D.H., 2010. Immune pathology

- associated with altered actin cytoskeleton regulation. *Autoimmunity* 43, 64–75.
- Wikfors, G.H., Alix, J.H., 2014. Granular hemocytes are phagocytic, but agranular hemocytes are not, in the Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. *Invertebr. Immun.* 1, 15–21.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F., 1996. Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis* 17, 830–8.
- Wilkins, M.R., Appel, R.D., 2007. Ten Years of the Proteome Introduction to the Proteome. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 5–7.
- Williams, K.L., Hochstrasser, D.F., 1997. Introduction to the proteome. *Proteome Res. New Front. Funct. genomics* 1–12.
- Wilm, M., 2011. Principles of electrospray ionization. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M111.009407.
- Wirth, D., Gustin, P., Drion, P., Dessy-Doize, C., Christians, E.S., 2002. Les protéines de choc thermique (heat shock proteins). I: Classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques. *Ann. Médecine Vétérinaire* 146.
- Wittmann-Liebold, B., Graack, H.R., Pohl, T., 2006. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics*.
- Wolin, S.L., Cedervall, T., 2002. The La protein. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 375–403.
- Wolvetang, E.J., Johnson, K.L., Krauer, K., Ralph, S.J., Linnane, A.W., 1994. Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Lett.* 339, 40–44.
- Wootton, E., Dyrinda, E., Ratcliffe, N., 2003. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish Shellfish Immunol.* 15, 195–210.
- Wu, H., Ji, C., Wei, L., Zhao, J., Lu, H., 2013a. Proteomic and metabolomic responses in hepatopancreas of *Mytilus galloprovincialis* challenged by *Micrococcus luteus* and *Vibrio anguillarum*. *J. Proteomics* 94, 54–67.
- Wu, H., Liu, X., Zhang, X., Ji, C., Zhao, J., 2013b. Proteomic and metabolomic responses of clam *Ruditapes philippinarum* to arsenic exposure under different salinities. *Aquat. Toxicol.* 136–137, 91–100.
- Wu, J., Lin, Q., Lim, T.K., Liu, T., Hew, C.L., 2007. White spot syndrome virus proteins and differentially expressed host proteins identified in shrimp epithelium by shotgun proteomics and cleavable isotope-coded affinity tag. *J. Virol.* 81, 11681–11689.
- Wu, L., Wu, X., Deng, H., Huang, Y., 2010. First identification and functional analysis of a histidine triad nucleotide binding protein in an invertebrate species *Haliotis diversicolor supertexta*. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 76–83.
- Wu, L., Wang, L., Wu, X., 2011. Generation and analysis of cDNA library from lipopolysaccharide-stimulated gastropod abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) hemocytes 10, 7975–7980.
- Wu, S.Z., Huang, X.-D., Li, Q., He, M.-X., 2013. Interleukin-17 in pearl oyster (*Pinctada fucata*): molecular cloning and functional characterization. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1050–1056.
- Xiang, Z., Qu, F., Li, J., Qi, L., Yang, Z., Kong, X., Yu, Z., 2014. Activator protein-1 (AP-1) and response to pathogen infection in the Hong Kong oyster (*Crassostrea hongkongensis*). *Fish Shellfish Immunol.* 36, 83–9.
- Xie, Q.W., Whisnant, R., Nathan, C., 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 177, 1779–1784.
- Xing, J., Lin, T., Zhan, W., 2008. Variations of enzyme activities in the haemocytes of scallop



- Chlamys farreri* after infection with the acute virus necrobiotic virus (AVNV). Fish Shellfish Immunol. 25, 847–852.
- Xiong, X., Feng, Q., Chen, L., Xie, L., Zhang, R., 2008. Cloning and characterization of an IKK homologue from pearl oyster, *Pinctada fucata*. Dev. Comp. Immunol.
- Xu, B., Hellman, U., Ersson, B., Janson, J.-C., 2000. Purification, characterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo- $\beta$ -1,4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. Eur. J. Biochem. 267, 4970–4977.
- Xu, T., Xie, J., Li, J., Luo, M., Ye, S., Wu, X., 2012. Identification of expressed genes in cDNA library of hemocytes from the RLO-challenged oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould with special functional implication of three complement-related fragments (CaC1q1, CaC1q2 and CaC3). Fish Shellfish Immunol. 32, 1106–1116.
- Xu, Y.H., Bi, W.J., Wang, X.W., Zhao, Y.R., Zhao, X.F., Wang, J.X., 2014. Two novel C-type lectins with a low-density lipoprotein receptor class A domain have antiviral function in the shrimp *Marsupenaes japonicus*. Dev. Comp. Immunol. 42, 323–332.
- Xue, Q., Renault, T., 2000. Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. J. Invertebr. Pathol. 76, 155–163.
- Xue, Q., Renault, T., Cochenne, N., Gerard, A., 2000. Separation of European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemocytes by density gradient centrifugation and SDS-PAGE characterisation of separated haemocyte sub-populations. Fish Shellfish Immunol. 10, 155–65.
- Xue, Q.G., Renault, T., Chilmonczyk, S., 2001. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. Fish Shellfish Immunol. 11, 557–567.
- Xue, Q.-G., Schey, K.L., Volety, A.K., Chu, F.-L.E., La Peyre, J.F., 2004. Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 139, 11–25.
- Xue, Q.G., Waldrop, G.L., Schey, K.L., Itoh, N., Ogawa, M., Cooper, R.K., Losso, J.N., La Peyre, J.F., 2006. A novel slow-tight binding serine protease inhibitor from eastern oyster (*Crassostrea virginica*) plasma inhibits perkinsin, the major extracellular protease of the oyster protozoan parasite *Perkinsus marinus*. Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol. 145, 16–26.
- Xue, Z., Li, H., Wang, X., Li, X., Liu, Y., Sun, J., Liu, C., 2015. A review of the immune molecules in the sea cucumber. Fish Shellfish Immunol. 44, 1–11.
- Yahara, I., Minami, Y., Miyata, Y., 1998. The 90-kDa stress protein, Hsp90, is a novel molecular chaperone. Ann. N. Y. Acad. Sci. 851, 54–60.
- Yamamoto, M., Okamoto, T., Takeda, K., Sato, S., Sanjo, H., Uematsu, S., Saitoh, T., Yamamoto, N., Sakurai, H., Ishii, K.J., Yamaoka, S., Kawai, T., Matsuura, Y., Takeuchi, O., Akira, S., 2006. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. Nat. Immunol. 7, 962–970.
- Yamaura, K., Takahashi, K.G., Suzuki, T., 2008. Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 149, 168–175.
- Yang, B., Qin, J., Shi, B., Han, G., Chen, J., Huang, H., Ke, C., 2012. Molecular characterization and functional analysis of adrenergic like receptor during larval metamorphosis in *Crassostrea angulata*. Aquaculture 366–367, 54–61.
- Yang, C., Wang, L., Jiang, Q., Wang, J., Yue, F., Zhang, H., Sun, Z., Song, L., 2013. The polymorphism in the promoter region of metallothionein 1 is associated with heat tolerance of scallop *Argopecten irradians*. Gene 526, 429–436.
- Yang, H.S., Hong, H.K., Donaghy, L., Noh, C.H., Park, H.S., Kim, D.S., Choi, K.S., 2015.

- Morphology and Immune-related activities of hemocytes of the mussel *Mytilus coruscus* (Gould, 1861) from East Sea of Korea. *Ocean Sci. J.* 50, 77–85.
- Yang, J., Qiu, L., Wang, L., Wei, X., Zhang, H., Zhang, Y., Liu, L., Song, L., 2010. CfLGBP, a pattern recognition receptor in *Chlamys farreri* involved in the immune response against various bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 825–831.
- Yang, J., Qiu, L., Wang, L., Huang, M., Wang, L., Zhang, H., Song, L., 2011a. A TRAF and TNF receptor-associated protein (TTRAP) in mollusk with endonuclease activity. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 827–834.
- Yang, J., Wang, L., Zhang, H., Qiu, L., Wang, H., Song, L., 2011b. C-type Lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) mediating immune recognition and opsonization. *PLoS One* 6.
- Yang, Q., Yang, Z., Li, H., 2011. Molecular characterization and expression analysis of an inhibitor of NF- $\kappa$ B (IkB) from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix*. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 485–90.
- Yang, S., Wu, X., 2010. Identification and functional characterization of a human sTRAIL homolog, CasTRAIL, in an invertebrate oyster *Crassostrea ariakensis*. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 538–545.
- Yang, Z., Wu, H., Li, Y., 2012. Toxic effect on tissues and differentially expressed genes in hepatopancreas identified by suppression subtractive hybridization of freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) following microcystin-LR challenge. *Environ. Toxicol.* 27, 393–403.
- Ye, S., Wu, L., Luo, M., Xu, T., Wu, X., 2013. Characterization and function of an E2-17 kDa (UBE2D) in an invertebrate *Haliotis diversicolor supertexta*. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1496–504.
- Yokota, S., Yanagi, H., Yura, T., Kubota, H., 1999. Cytosolic chaperonin is up-regulated during cell growth. Preferential expression and binding to tubulin at G(1)/S transition through early S phase. *J. Biol. Chem.* 274, 37070–8.
- Yonge, C.M., 1926. Structure and physiology of the organs of feeding and digestion in *Ostrea edulis*.
- Yoshimura, A., Nishinakamura, H., Takaki, H., 2005. SOCS genes: Critical regulators of cytokine signaling and immune responses. *Int. Congr. Ser.* 1285, 121–129.
- Yoshimura, A., Naka, T., Kubo, M., 2007. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 454–465.
- Yoshino, T.P., Vasta, G.R., 1996. Parasite-Invertebrate Host Immune Interactions, in: EL Cooper, Springer-Verlag, H. (Ed.), *Invertebrate Immune Responses: Cell Activities and the Environment*. pp. 125–167.
- Yu, F., Zhang, Y., Yu, Z., 2012. Characteristics and expression patterns of the lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  factor (LITAF) gene family in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 899–908.
- Yu, S.-W., Andrabi, S.A., Wang, H., Kim, N.S., Poirier, G.G., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2006. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Yu, X.Q., Tracy, M.E., Ling, E., Scholz, F.R., Trenczek, T., 2005. A novel C-type immulectin-3 from *Manduca sexta* is translocated from hemolymph into the cytoplasm of hemocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 285–295.
- Yu, Y., Clippinger, A.J., Alwine, J.C., 2011. Viral effects on metabolism: Changes in glucose and glutamine utilization during human cytomegalovirus infection. *Trends Microbiol.* 19, 360–367.
- Yu, Y., Qiu, L., Song, L., Zhao, J., Ni, D., Zhang, Y., Xu, W., 2007. Molecular cloning and characterization of a putative lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  activity factor



- (LITAF) gene homologue from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Fish Shellfish Immunol. 23, 419–429.
- Zelensky, A.N., Gready, J.E., 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. FEBS J.
- Zahoor, Z., Lockyer, A.E., Davies, A.J., Kirk, R.S., Emery, A.M., Rollinson, D., Jones, C.S., Noble, L.R., Walker, A.J., 2014. Differences in the Gene Expression Profiles of Haemocytes from Schistosoma Susceptible and Resistant *Biomphalaria glabrata* Exposed to *Schistosoma mansoni* Excretory-Secretory Products. PLoS One 9, e93215.
- Zha, G., Chen, V.P., Luk, W.K.W., Zou, X., Choi, R.C.Y., Tsim, K.W.K., 2013. Characterization of acetylcholinesterase in Hong Kong oyster (*Crassostrea hongkongensis*) from South China Sea. Chem. Biol. Interact. 203, 277–281.
- Zhang, D., Jiang, J., Jiang, S., Ma, J., Su, T., Qiu, L., Zhu, C., Xu, X., 2009a. Molecular characterization and expression analysis of a putative LPS-induced TNF-alpha factor (LITAF) from pearl oyster *Pinctada fucata*. Fish Shellfish Immunol. 27, 391–396.
- Zhang, D., Jiang, S., Qiu, L., Su, T., Wu, K., Li, Y., Zhu, C., Xu, X., 2009b. Molecular characterization and expression analysis of the IkappaB gene from pearl oyster *Pinctada fucata*. Fish Shellfish Immunol. 26, 84–90.
- Zhang, D., Ma, J., Jiang, J., Qiu, L., Zhu, C., Su, T., Li, Y., Wu, K., Jiang, S., 2010. Molecular characterization and expression analysis of lipopolysaccharide and b-1,3-glucan-binding protein (LGBP) from pearl oyster *Pinctada fucata*. Mol. Biol. Rep. 37, 3335–43.
- Zhang, D., Ma, J., Jiang, S., 2013. Molecular characterization, expression and function analysis of a five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from pearl oyster *Pinctada fucata*. Fish Shellfish Immunol 1–7.
- Zhang, D.C., Hu, Y.T., Guo, H.Y., Cui, S.G., Su, T.F., Jiang, S.G., 2011. cDNA cloning and mRNA expression of a tandem-repeat galectin (PoGal2) from the pearl oyster, *Pinctada fucata*. Genet. Mol. Res. 10, 1963–1974.
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., Xiong, Z., Que, H., Xie, Y., Holland, P.W.H., Paps, J., Zhu, Y., Wu, F., Chen, Y., Wang, J., Peng, C., Meng, J., Yang, L., Liu, J., Wen, B., Zhang, N., Huang, Z., Zhu, Q., Feng, Y., Mount, A., Hedgecock, D., Xu, Z., Liu, Y., Domazet-Lošo, T., Du, Y., Sun, X., Zhang, S., Liu, B., Cheng, P., Jiang, X., Li, J., Fan, D., Wang, W., Fu, W., Wang, T., Wang, B., Zhang, J., Peng, Z., Li, Y., Li, N., Wang, J., Chen, M., He, Y., Tan, F., Song, X., Zheng, Q., Huang, R., Yang, H., Du, X., Chen, L., Yang, M., Gaffney, P.M., Wang, S., Luo, L., She, Z., Ming, Y., Huang, W., Zhang, S., Huang, B., Zhang, Y., Qu, T., Ni, P., Miao, G., Wang, J., Wang, Q., Steinberg, C.E.W., Wang, H., Li, N., Qian, L., Zhang, G., Li, Y., Yang, H., Liu, X., Wang, J., Yin, Y., Wang, J., 2012. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. Nature 490, 49–54.
- Zhang, H., Song, L., Li, C., Zhao, J., Wang, H., Gao, Q., Xu, W., 2007. Molecular cloning and characterization of a thioester-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Mol. Immunol. 44, 3492–3500.
- Zhang, H., Song, L., Li, C., Zhao, J., Wang, H., Qiu, L., Ni, D., Zhang, Y., 2008. A novel C1q-domain-containing protein from Zhikong scallop *Chlamys farreri* with lipopolysaccharide binding activity. Fish Shellfish Immunol. 25, 281–289.
- Zhang, H., Wang, H., Wang, L., Song, L., Song, X., Zhao, J., Li, L., Qiu, L., 2009a. Cflec-4, a multidomain C-type lectin involved in immune defense of Zhikong scallop *Chlamys farreri*. Dev. Comp. Immunol. 33, 780–788.
- Zhang, H., Wang, L., Song, L., Song, X., Wang, B., Mu, C., Zhang, Y., 2009b. A fibrinogen-related protein from bay scallop *Argopecten irradians* involved in innate immunity as

- pattern recognition receptor. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 56–64.
- Zhang, H., Wang, L., Song, L., Zhao, J., Qiu, L., Gao, Y., Song, X., Li, L., Zhang, Y., Zhang, L., 2009c. The genomic structure, alternative splicing and immune response of *Chlamys farreri* thioester-containing protein. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 1070–1076.
- Zhang, H., Song, X., Wang, L., Kong, P., Yang, J., Liu, L., Qiu, L., Zhang, Y., Qiu, L., Song, L., 2011. AiCTL-6, a novel C-type lectin from bay scallop *Argopecten irradians* with a long C-type lectin-like domain. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 17–26.
- Zhang, J., Tachado, S.D., Patel, N., Zhu, J., Imrich, A., Manfrueli, P., Cushion, M., Kinane, T.B., Koziel, H., 2005. Negative regulatory role of mannose receptors on human alveolar macrophage proinflammatory cytokine release in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 78, 665–674.
- Zhang, J., Li, F., Jiang, H., Yu, Y., Liu, C., Li, S., Wang, B., Xiang, J., 2010. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in lymphoid organ of *Fenneropenaeus chinensis* response to *Vibrio anguillarum* stimulation. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 186–94.
- Zhang, L., Li, L., Zhang, G., 2011a. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 653–660.
- Zhang, L., Li, L., Zhang, G., 2011b. Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 603–10.
- Zhang, L., Qiu, L., Wu, H., Liu, X., You, L., Pei, D., Chen, L., Wang, Q., Zhao, J., 2012. Expression profiles of seven glutathione S-transferase (GST) genes from *Venerupis philippinarum* exposed to heavy metals and benzo[a]pyrene. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 155, 517–527.
- Zhang, L., Li, L., Zhu, Y., Zhang, G., Guo, X., 2014. Transcriptome Analysis Reveals a Rich Gene Set Related to Innate Immunity in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*). *Mar. Biotechnol.* 16, 17–33.
- Zhang, L., Li, L., Guo, X., Litman, G.W., Dishaw, L.J., Zhang, G., 2015. Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Sci. Rep.* 5, 86–93.
- Zhang, N., Aebersold, R., Schwikowski, B., 2002. ProBID: A probabilistic algorithm to identify peptides through sequence database searching using tandem mass spectral data. *Proteomics* 2, 1406–1412.
- Zhang, Q.H., Huang, L., Zhang, Y., Ke, C.H., Huang, H.Q., 2013. Proteomic approach for identifying gonad differential proteins in the oyster (*Crassostrea angulata*) following food-chain contamination with HgCl<sub>2</sub>. *J. Proteomics* 94, 37–53.
- Zhang, T., Qiu, L., Sun, Z., Wang, L., Zhou, Z., Liu, R., Yue, F., Sun, R., Song, L., 2014. The specifically enhanced cellular immune responses in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) against secondary challenge with *Vibrio splendidus*. *Dev. Comp. Immunol.* 45, 141–150.
- Zhang, Y., He, X., Yu, F., Xiang, Z., Li, J., Thorpe, K.L., Yu, Z., 2013a. Characteristic and Functional Analysis of Toll-like Receptors (TLRs) in the lophotrocozoan, *Crassostrea gigas*, Reveals Ancient Origin of TLR-Mediated Innate Immunity. *PLoS One* 8.
- Zhang, Y., Li, J., Yu, F., He, X., Yu, Z., 2013b. Allograft inflammatory factor-1 stimulates hemocyte immune activation by enhancing phagocytosis and expression of inflammatory cytokines in *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1071–7.
- Zhang, Y., Sun, J., Mu, H., Li, J., Zhang, Y., Xu, F., Xiang, Z., Qian, P., Qiu, J., Yu, Z., 2015. Proteomic Basis of Stress Responses in the Gills of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*.
- Zhang, Y.Y., Yu, F., Li, J., Tong, Y., Yu, Z., 2014. The first invertebrate RIG-I-like receptor

- (RLR) homolog gene in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. Fish Shellfish Immunol. 40, 466–71.
- Zhang, Z.Q., 2013. Animal biodiversity: An update of classification and diversity in 2013. Zootaxa 3703, 5.
- Zhang, Z., Deb, A., Zhang, Z., Pachori, A., He, W., Guo, J., Pratt, R., Dzau, V.J., 2009. Secreted frizzled related protein 2 protects cells from apoptosis by blocking the effect of canonical Wnt3a. J. Mol. Cell. Cardiol.
- Zhang, Z., Zhang, Q., 2012. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 70 gene from the oyster *Crassostrea hongkongensis* responding to thermal stress and exposure of Cu 2+ and malachite green. Gene 497, 172–180.
- Zhao, J., Li, C., Chen, A., Li, L., Su, X., Li, T., 2010. Molecular characterization of a novel big defensin from clam *Venerupis philippinarum*. PLoS One 5, 1–6.
- Zhao, J.M., Song, L.S., Li, C.H., Ni, D.J., Wu, L.T., Zhu, L., Wang, H., Xu, W., 2007. Molecular cloning, expression of a big defensin gene from bay scallop *Argopecten irradians* and the antimicrobial activity of its recombinant protein. Mol. Immunol. 44, 360–368.
- Zhao, W., Wang, L., Zhang, M., Wang, P., Yuan, C., Qi, J., Meng, H., Gao, C., 2012. Tripartite motif-containing protein 38 negatively regulates TLR3/4- and RIG-I-mediated IFN- $\beta$  production and antiviral response by targeting NAP1. J. Immunol. 188, 5311–8.
- Zhao, X., Yu, H., Kong, L., Li, Q., 2016. Gene Co-Expression Network Analysis Reveals the Correlation Patterns Among Genes in Euryhaline Adaptation of *Crassostrea gigas*. Mar. Biotechnol. 18, 535–544.
- Zheng, P., Wang, H., Zhao, J., Song, L., Qiu, L., Dong, C., Wang, B., Gai, Y., Mu, C., Li, C., Ni, D., Xing, K., 2008. A lectin (CfLec-2) aggregating *Staphylococcus haemolyticus* from scallop *Chlamys farreri*. Fish Shellfish Immunol. 24, 286–293.
- Zhou, J., Cai, Z.-H., Li, L., Gao, Y.-F., Hutchinson, T.H., 2010. A proteomics based approach to assessing the toxicity of bisphenol A and diallyl phthalate to the abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). Chemosphere 79, 595–604.
- Zhou, X., Ding, Y., Wang, Y., 2012. Proteomics: present and future in fish, shellfish and seafood. Rev. Aquac. 4, 11–20.
- Zhou, Z., Wang, L., Shi, X., Yue, F., Wang, M., Zhang, H., Song, L., 2012. The expression of dopa decarboxylase and dopamine beta hydroxylase and their responding to bacterial challenge during the ontogenesis of scallop *Chlamys farreri*. Fish Shellfish Immunol. 33, 67–74.
- Zhu, L., Song, L., Chang, Y., Xu, W., Wu, L., 2006. Molecular cloning, characterization and expression of a novel serine proteinase inhibitor gene in bay scallops (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819). Fish Shellfish Immunol. 20, 320–331.
- Zinker, S., Warner, J.R., 1976. The ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. Phosphorylated and exchangeable proteins. J Biol Chem 251, 1799–1807.
- Zou, J., Chang, M., Nie, P., Secombes, C.J., 2009. Origin and evolution of the RIG-I like RNA helicase gene family. BMC Evol. Biol. 9, 85.
- Zubarev, R.A., Kelleher, N.L., McLafferty, F.W., 1998. Electron capture dissociation of multiply charged protein cations. A nonergodic process. J. Am. Chem. Soc.
- Zwickl, P., Seemüller, E., Kapelari, B., Baumeister, W., 2001. The proteasome: A supramolecular assembly designed for controlled proteolysis. Adv. Protein Chem. 59, 187–222.