



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Estudio de la expresión génica en *Mytilus galloprovincialis* tras la exposición a *Prorocentrum lima* empleando PCR cuantitativa en tiempo real

Estudo da expresión xénica en *Mytilus galloprovincialis* tras a exposición a *Prorocentrum lima* empregando PCR cuantitativa en tempo real

Gen expression study in *Mytilus galloprovincialis* after exposure to *Prorocentrum lima* using quantitative real-time PCR

Ricardo Francisco Pan Lizcano

Julio, 2018

Director(es) Académico(s): M^a Luisa Martínez Martínez y M^a Verónica PregoFaraldo



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Las doctoras M^a Luisa Martínez Martínez y María Verónica Prego Faraldo informan que el presente Trabajo de Fin de Grado titulado “**Estudio de la expresión génica en *Mytilus galloprovincialis* tras la exposición a *Prorocentrum lima* empleando PCR cuantitativa en tiempo real**” que presenta el alumno Ricardo Francisco Pan Lizcano ha sido elaborado bajo nuestra supervisión y, considerándolo finalizado, damos nuestro visto bueno para su presentación y defensa ante el tribunal calificador.

A Coruña, 17 de julio de 2018

Fdo. M^a Luisa Martínez Martínez

Fdo. María Verónica Prego Faraldo

ÍNDICE

Resumen / Summary / Resumen

Palabras clave / Key words / Palabras clave

1. Introducción	3 - 8
2. Objetivo	8
3. Material y métodos	9 - 12
4. Resultados	12 - 16
5. Discusión	16 - 17
6. Conclusión / Conclusion / Conclusión	18
7. Bibliografía	19 - 23

RESUMEN

Las mareas rojas (*Harmful Algal Blooms*, HABs) son un problema ecológico y sanitario cada vez más frecuente en las costas gallegas y en todo el mundo. En Galicia las HABs más comunes son las producidas por microalgas productoras de toxinas diarreicas (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*, DSP). El mejillón *Mytilus galloprovincialis* es uno de los principales vectores de las toxinas DSP. Además, es un organismo centinela de la contaminación, idóneo para el estudio y comprensión de los efectos genotóxicos y citotóxicos que estas toxinas tienen sobre los bivalvos y los ecosistemas. En Galicia, el mejillón es un importante recurso para la economía local a través de su explotación acuícola. Las HABs pueden suponer unas pérdidas económicas cuantiosas para este sector lo que supone un valor añadido para el estudio y comprensión de estos fenómenos y los efectos que causan.

En este trabajo se estudian los posibles efectos que pueden tener las toxinas DSP en la expresión de las caspasas 3/7-1, 3/7-3 y 3/7-4 en *M. galloprovincialis*, ya que éstas tienen un papel importante en la apoptosis. Para ello, se usaron muestras de branquia de mejillón tomadas bajo dos condiciones experimentales: una control y otra tratamiento (exposición a 100.000 células/L de *Prorocentrum lima* durante 24 h). De las muestras se extrajo el ARN y éste se utilizó, a través de una qPCR, para detectar las posibles diferencias de expresión.

Aunque los resultados finales no muestran una expresión diferencial, estos aportan más información para la comprensión del proceso apoptótico en *M. galloprovincialis* y sus mecanismos de defensa ante las toxinas.

SUMMARY

Harmful algal blooms are an ecological and health problem, which is becoming more frequent in the Galician coast and all over the world. In Galicia the more frequent ones are those originated by microalgae producers of DSP toxins (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*). The mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* is one of the main vectors of DSP intoxication in humans. Also, it is considered a sentinel organism of pollution, perfect for the assessment and understanding of the genotoxic and cytotoxic effects that these phenomena inflict on bivalves and ecosystems. In Galicia, mussel farming is a major economic resource for local economy and HABs are able to produce important losses to this activity. This fact makes the study and understanding of HABs and its effects even more crucial.

In this study, the effects that DSP toxins can produce in the expression of caspases 3/7-1, 3/7-3 and 3/7-4 in *M. galloprovincialis* are investigated, since these proteins are associated with an important role in the apoptosis. For this aim, gill samples taken under two different experimental conditions were used: control and treated (24 h treatment with *Prorocentrum lima*, 100,000 cells/L). From the samples the RNA was extracted and used, through a qPCR, to assess a possible differential expression.

Even though results do not show a differential gene expression, they contribute to the understanding of the apoptotic process in *M. galloprovincialis* and its defense mechanisms against toxins.

RESUMO

As mareas vermellas (Harmful Algal Blooms, HABs) son un problema ecolóxico e sanitario cada vez máis frecuente nas costas galegas e en todo o mundo. En Galicia as HABs máis comúns son as producidas por microalgas produtoras de toxinas diarreicas (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*, DSP). O mexillón *Mytilus galloprovincialis* é un dos principais vectores de intoxicación con toxinas DSP. Ademais, é un organismo sentinela da contaminación, idóneo para o estudo e

comprensión dos efectos xenotóxicos e citotóxicos que estes fenómenos teñen sobre os bivalvos e os ecosistemas. En Galicia, o mexillón é un importante recurso para a economía local a través da súa explotación acuícola. As HABs poden supoñer unhas perdas económicas cuantiosas para este sector o que supón un valor engadido para o estudo e comprensión destes fenómenos e os efectos que causan.

Neste traballo estúdanse os posibles efectos que poden ter as toxinas DSP na expresión das caspasas 3/7-1, 3/7-3 e 3/7-4 en *M. galloprovincialis*, xa que éstas están asociadas a un papel importante na apoptose. Para iso empregáronse mostras de branquia de mexillón tomadas baixo dúas condicións experimentais: unha control e outra tratamento (exposición a *Prorocentrum lima*, 100.000 células/ L durante 24 h). Destas mostras extraeuse o ARN, que sería utilizado, a través dunha qPCR, para detectar as posibles diferenzas de expresión.

Aínda que os resultados finais non mostran unha expresión diferencial, estes achegan máis información para a comprensión do proceso apoptótico en *M. galloprovincialis* e os seus mecanismos de defensa ante as toxinas.

PALABRAS CLAVE

Moluscos bivalvos, Toxinas DSP, Caspasas, Apoptosis, qPCR, HABs, *Mytilus galloprovincialis* Transcriptoma.

KEY WORDS

Bivalve molluscs, DSP toxins, Caspases, Apoptosis, qPCR, HABs, *Mytilus galloprovincialis*, Transcriptome.

PALABRAS CRAVE

Moluscos bivalvos, Toxinas DSP, Caspasas, Apoptose, qPCR, HABs, *Mytilus galloprovincialis*, Transcriptoma.

1. Introducción

- *Harmful Algal Blooms (HABs)*

Las mareas rojas, técnicamente denominadas *Harmful Algal Blooms (HABs)* son un fenómeno de contaminación natural que se produce cuando una o unas pocas especies de microalgas aumentan de manera exponencial su biomasa debido a diversos factores ambientales, tales como el aumento de nutrientes o condiciones climáticas y oceánicas favorables (Granéli & Turner, 2006).

Las HABs se han vuelto más frecuentes y duraderas en los últimos años, lo que puede estar causado por diversos factores, como el cambio climático o las actividades antropogénicas. El calentamiento global producto del cambio climático, puede influir en el incremento relativo del número de dinoflagelados en ecosistemas regionales a causa de la subida de las temperaturas. Esta subida de temperaturas posibilita el aumento del lapso temporal de aparición de HABs, desde principios de primavera hasta finales de otoño. Además, aumenta el rango biogeográfico de aparición de especies de microalgas tropicales o subtropicales hacia latitudes más altas (Granéli & Turner, 2006). Aunque las evidencias existentes sobre la relación entre el cambio climático y el aumento de las HABs no son del todo concluyentes, en los datos fósiles se han encontrado indicios de que la subida de las temperaturas va unida a un incremento en el porcentaje de dinoflagelados (Granéli & Turner, 2006). Por otra parte, la contaminación con nutrientes de origen antropogénico en los ecosistemas marinos (eutrofización), así como el aumento del uso de zonas costeras para la acuicultura y la introducción de nuevas especies de microalgas tóxicas (a través de barcos en el agua de lastre o con la transferencia de bivalvos) (Lassus *et al.*, 2016), han propiciado que las microalgas puedan alcanzar mayores biomasa y conseguir una mayor aparición tanto temporal como geográfica.

El interés por las HABs responde a los daños que éstas causan en los ecosistemas y en los seres humanos de manera indirecta. Así, algunas de las microalgas que originan HABs, son capaces de producir toxinas que pueden ser acumuladas por organismos marinos filtradores y posteriormente ser transferidas a través de la cadena alimentaria, pudiendo causar intoxicaciones en humanos (Figura 1) (Prego-Faraldo *et al.*, 2013).

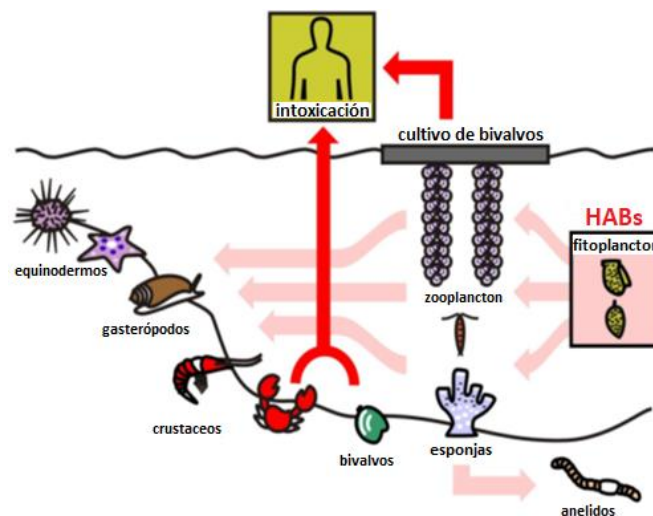


Figura 1: Esquema que ilustra la bioamplificación de las toxinas marinas a través de la cadena trófica. Imagen extraída y modificada de Prego-Faraldo *et al.* (2013).

Las toxinas marinas producidas durante las HABs se pueden clasificar en seis grupos distintos atendiendo a la sintomatología que causan en humanos: toxinas diarreicas (*Diarrhetic Shellfish Poisoning, DSP*), paralíticas (*Paralytic Shellfish Poisoning, PSP*), amnésicas (*Amnesic Shellfish Poisoning, ASP*), neurotóxicas (*Neurologic Shellfish Poisoning, NSP*), azaspirácidas (*Azaspiracid Poisoning, AZP*) y ciguatoxinas (*Ciguatera Fish Poisoning, CFP*) (Martín *et al.*, 1996). De entre todas ellas, las toxinas DSP son las más frecuentes en las HABs detectadas en Galicia (Ruiz-Villarreal *et al.*, 2016).

Las HABs pueden llevar asociadas otras consecuencias negativas para el ser humano, entre ellas, pérdidas económicas para el sector acuícola por la acumulación de niveles de toxinas superiores a los permitidos en los cultivos de marisco o pescado, lo que impide su comercialización (Lassus *et al.*, 2016). En Galicia, las HABs empezaron a suponer un problema a mediados de la década de los 70, pero su frecuencia y duración han ido en aumento. Estos fenómenos suponen una gran presión para el sector acuícola, ya que dependiendo de la intensidad de las HABs, la recolección del marisco puede llegar a prohibirse durante largos períodos en algunos polígonos o zonas de extracción, como lo sucedido durante el año 2013 en las rías gallegas, donde la producción de mejillón cayó un 19,4% con respecto a 2012 debido a sucesiones de HABs, suponiendo una pérdida de aproximadamente 20 millones de euros para el sector (Xunta de Galicia, 2017).

- **Toxinas DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*)**

Las toxinas DSP son producidas por especies de fitoplancton pertenecientes a los géneros *Dinophysis*, *Phalacroma* y *Prorocentrum*. Son compuestos liposolubles que se acumulan con facilidad en organismos marinos filtradores como los moluscos bivalvos, y que causan intoxicación diarreica en consumidores humanos. Esta intoxicación causa diarrea, náuseas, vómitos y dolores abdominales, que aparecen aproximadamente a los 30 minutos del consumo de marisco contaminado y duran entre dos y tres días (Martín *et al.*, 1996).

Las toxinas DSP se clasifican en tres grupos según su estructura química: ácido ocadaico (AO) y dinofisistoxinas (poliéteres termoestables con efecto diarreico), pectenotoxinas (poliéteres macrocíclicos con un anillo de lactona y sin efecto diarreico) y yesotoxinas (poliéter tipo brevetoxina y sin efecto diarreico) (Reguera *et al.*, 2014).

Las HABs causadas por microalgas productoras de toxinas DSP son un problema a nivel global, siendo el Noroeste de Europa la zona del globo donde estos episodios se producen con mayor frecuencia (Figura 2). Dentro de las toxinas DSP, el AO es la que ha recibido mayor atención debido a que se produce en mayor cantidad y por lo tanto se considera la principal responsable de las intoxicaciones diarreicas (Reguera *et al.*, 2014).

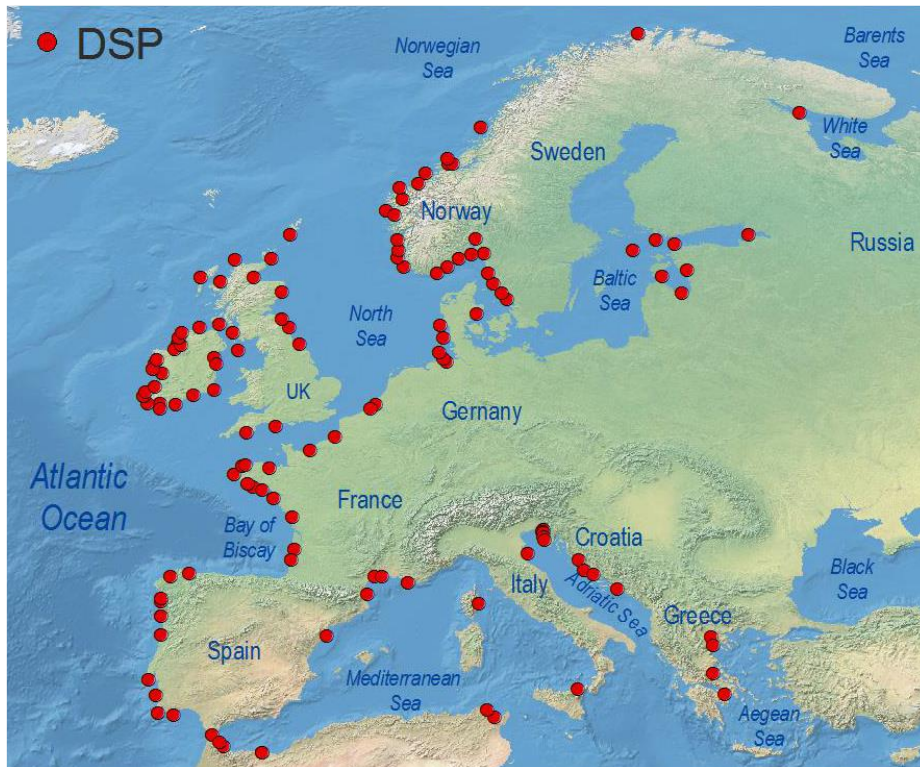


Figura 2: Zonas geográficas de Europa donde se ha detectado presencia de toxinas producidas por dinoflagelados del género *Dinophysis*. Imagen extraída de Reguera *et al.* (2014).

Los bivalvos son organismos filtradores que acumulan las toxinas DSP por consumo directo de los organismos productores de éstas. En ellos causan diversos efectos, tales como el descenso del ritmo de filtrado o la inflamación del sistema digestivo (Romero-Geraldo *et al.*, 2014). Más concretamente, el AO produce inhibición de las proteínas serina/treonina fosfatasa PP1 y PP2A (Bialojan & Takai, 1988), así como efectos citotóxicos y genotóxicos en bivalvos (Prego-Faraldo *et al.*, 2013).

En las costas gallegas se pueden encontrar diversas especies productoras de toxinas DSP, siendo las más comunes *Dinophysis acuta* (Figura 3A) y *Dinophysis acuminata* (Figura 3B). La primera es una especie de climas templados y fríos, que suele aparecer a finales de verano o principios de otoño, mientras que la segunda es una especie muy cosmopolita que suele aparecer en primavera y permanecer hasta otoño (Reguera *et al.*, 2014).

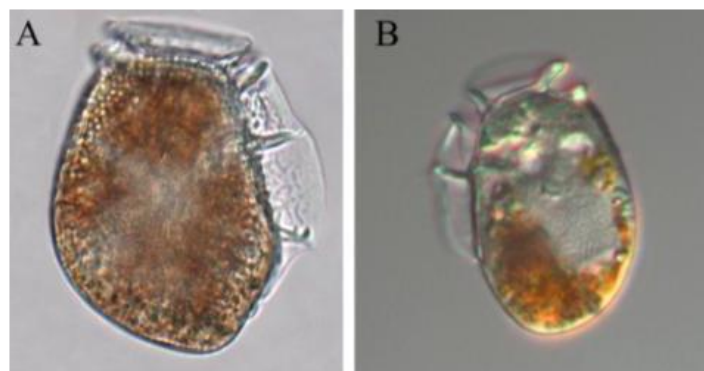


Figura 3: A: *Dinophysis acuta*; B: *Dinophysis acuminata*. Imagen extraída de Reguera *et al.* (2014).

Existen otras especies productoras de toxinas DSP que, aunque presentes en menor medida en las costas europeas, son clave en las investigaciones sobre los efectos de las toxinas DSP en los organismos marinos debido a su toxicidad, amplia distribución geográfica y facilidad para el establecimiento de su cultivo. Una de ellas es *Prorocentrum lima*. Esta especie es de las más usadas para evaluar los efectos de las toxinas DSP en los organismos marinos (Bauder *et al.*, 2001; Florez-Barros *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2015)

- **El mejillón como organismo centinela de la contaminación**

El mejillón es un molusco bivalvo de amplia distribución geográfica que presenta unas características biológicas y ecológicas óptimas para ser considerado organismo centinela de la contaminación (Beyer *et al.*, 2017). Se trata de un organismo sésil, de mediano tamaño, fácil de recolectar, resistente y fácil de mantener en cultivo. Además, el mejillón se alimenta por filtración, lo que permite que acumule grandes cantidades de contaminantes presentes en el agua, proporcionando una medida eficiente de la concentración y biodisponibilidad de los mismos (Beyer *et al.*, 2017).

Los tejidos de mejillón más empleados en los programas de monitorización de contaminantes son la branquia, la glándula digestiva y la hemolinfa. La branquia y la glándula digestiva se encargan de la nutrición, respiración, absorción y digestión, así como del proceso de acumulación y biotransformación de los compuestos tóxicos en el ambiente (Yavaşoğlu *et al.*, 2016), mientras que los hemocitos presentes en la hemolinfa son útiles para evaluar la respuesta inmune, los efectos citotóxicos y los efectos genotóxicos (Prego-Faraldo *et al.*, 2015).

En Galicia, *Mytilus galloprovincialis* es la especie de mejillón cultivada, con una producción anual de aproximadamente 200.000 toneladas (Xunta de Galicia, 2017). Las rías gallegas producen, aproximadamente, el 97% del mejillón cultivado en España. La producción del mejillón gallego también es espectacular cuando se compara con otras partes del mundo. Esto se debe a que los mejillones gallegos tardan tan solo 17 meses en alcanzar el tamaño comercial en las rías gallegas, mientras que en zonas de otros países tardan entre tres y cinco años. (Figueras A., 2007).

El uso del mejillón como organismo centinela de la contaminación y su importancia económica han llevado a la realización de numerosos estudios para evaluar los efectos que las toxinas DSP causan en él. Estos estudios han evidenciado que *M. galloprovincialis* parece ser capaz de reparar los daños producidos en el ADN por exposiciones cortas a AO (Prego-Faraldo *et al.*, 2015). Sin embargo, un estudio donde los mejillones fueron expuestos *in vivo* a *P. lima* mostró un aumento de la apoptosis frente a la necrosis, comportamiento que resultó más afectado por el tiempo de exposición que por la concentración de toxina (Prego-Faraldo *et al.*, 2016). Este último punto es de gran interés ya que el proceso de apoptosis está muy regulado y depende de numerosas señales internas de la célula. En los moluscos bivalvos, la apoptosis parece tener características únicas relacionadas con el estilo de vida sésil y la frecuente exposición a cambios ambientales, contaminantes y patógenos (Romero *et al.*, 2015).

- **Caspasas**

Las caspasas son enzimas que participan en el proceso de apoptosis, cortando proteínas en lugares concretos. Esto puede generar una cascada de reacciones (retroalimentación) que finalmente lleva al corte de proteínas esenciales para la función celular. Otra de las funciones de las caspasas es la activación de la ADNasa, produciendo la degradación del ADN celular, lo que finalmente conduce a la muerte de la célula (Pierce, 2012). Las caspasas pueden ser activadas a través de dos vías: extrínseca e intrínseca (Figura 4). En la vía extrínseca el proceso de apoptosis se ve inducido desde el exterior, a través de receptores transmembrana (receptores de muerte) los cuales desencadenan el proceso. En cambio, la vía intrínseca se induce intracelularmente y es mediada por la mitocondria.

En ambas vías las caspasas son componentes esenciales, implicadas en la transducción de la señal de muerte y son responsables de muchos cambios morfológicos y bioquímicos relacionados con la apoptosis. Se pueden categorizar en tres grupos dependiendo de su función: iniciadoras (caspasas 2, 8 y 9), efectoras (caspasas 3, 6 y 7) e inflamatorias (caspasas 1, 4 y 5) (Romero *et al.*, 2015).

La apoptosis puede ser la respuesta al daño producido por una enfermedad o toxina (Romero *et al.*, 2015), por lo que se podría esperar un cambio en la expresión de los genes de las caspasas, como respuesta a la exposición a toxinas DSP .

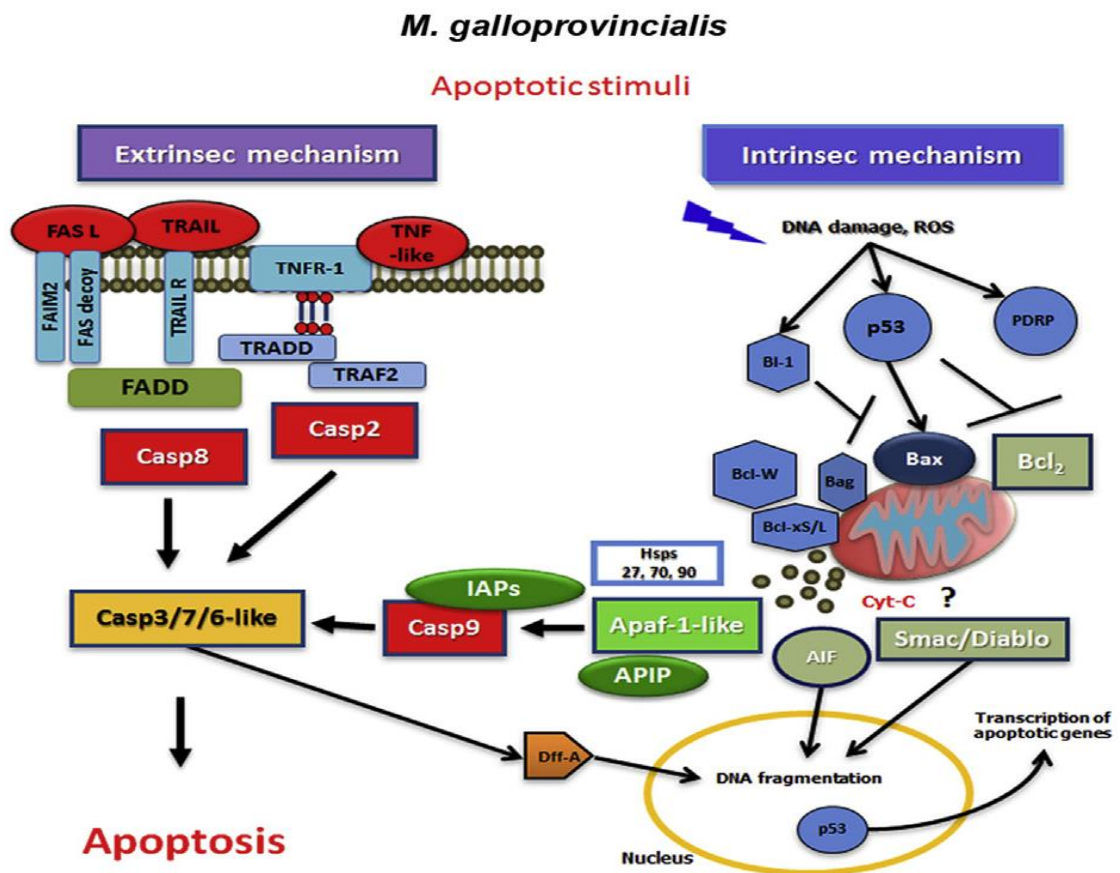


Figura 4: Rutas extrínseca e intrínseca de activación de las caspasas en *M. galloprovincialis*. Extraído de Romero *et al.* (2015).

- **Transcriptómica del *Mytilus galloprovincialis***

El estudio de las ómicas (genómica, epigenómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica) es una herramienta fundamental para poder comprender y caracterizar los efectos que producen los cambios ambientales en los organismos (Suárez-Ulloa *et al.*, 2013; Gómez-Chiarri *et al.*, 2015; Crocker *et al.*, 2016).

El estudio del transcriptoma permite el análisis de genes diferencialmente expresados en respuesta a diferentes contaminantes. Para ello pueden utilizarse librerías de ADNc, librerías sustractivas, microarrays o PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) (Suárez-Ulloa *et al.*, 2013; Detree *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017).

Una de las técnicas más usadas para estudiar la expresión génica es la qPCR. Esta técnica nos brinda la posibilidad de medir la amplificación del ADN a medida que se produce, lo que nos da la oportunidad de cuantificar la cantidad de muestra inicial comparando el número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente sea detectada. Así, a mayor cantidad de ADN inicial, menos ciclos son necesarios (Pabinger *et al.*, 2014). En esta técnica, la fluorescencia puede ser generada empleando principalmente dos tipos de fluorocromos: *SYBR Green* o sondas *TaqMan*[®]. *SYBR Green* es un fluorocromo inespecífico que se une al ADN de doble cadena produciendo fluorescencia, mientras que las sondas *TaqMan* son una alternativa específica al *SYBR Green* cuando se presentan problemas de especificidad. Por ello, el empleo de *SYBR Green*, aunque es más económico que el uso de sondas específicas, requiere de un diseño minucioso de los cebadores, con la finalidad de evitar señales inespecíficas (Galluzzi *et al.*, 2018).

En bivalvos, el marcador *SYBR Green* se ha utilizado con frecuencia en estudios de expresión génica. Por ejemplo, en la evaluación de la respuesta del sistema inmune del mejillón *Mytilus chilensis* frente a saxitoxinas (Astuya *et al.*, 2015; Detree *et al.*, 2016), la respuesta transcriptómica de la ostra *Crassostrea gigas* a la infección por la bacteria *Vibrio tubiashii* (Taris *et al.*, 2009) o la identificación de genes de la almeja *Sinonovacula constricta* implicados en procesos de detoxificación de Cd (Wang *et al.*, 2016).

2. Objetivo

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la expresión génica de las caspasas 2, 3/7-1, 3/7-2, 3/7-3, 3/7-4 y 8, en branquia de mejillón *M. galloprovincialis* tras su exposición a 100.000 células/L del dinoflagelado *Prorocentrum lima* durante 24 horas, con la finalidad de determinar la posible implicación de estas enzimas en el mecanismo de respuesta temprana del mejillón a las toxinas DSP.

3. Material y métodos

- **Obtención de muestras**

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron muestras congeladas a -80 °C de branquias extraídas de mejillones control (MBC) y expuestos a toxinas DSP (MBT). Estas muestras proceden de un experimento previamente llevado a cabo por miembros del grupo de investigación de Xenética de Organismos Mariños (XENOMAR), que se realizó con individuos adultos de mejillón *M. galloprovincialis*, libres de contaminación por toxinas DSP, recolectados en la playa de O Rañal (Arteixo, A Coruña). En este experimento, los individuos se aclimataron en el laboratorio durante una semana en tanques de agua de mar filtrada con aireación, localizados en una cámara de fotoperíodo (18 °C, ciclos de luz-oscuridad de 12 horas), y se alimentaron cuatro veces al día con una mezcla de algas no tóxicas (*Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suecica*). Tras el período de aclimatación, los mejillones se dividieron al azar en dos grupos, un grupo control y un grupo tratamiento. Durante 24 horas, el grupo control se alimentó con la mezcla de algas no tóxicas, mientras que el grupo tratamiento se alimentó también con 100.000 células/L del alga productora de toxinas DSP *P. lima* (Cepa AND-A0605). Trascorridas las 24 horas de exposición, las branquias de varios individuos se extrajeron, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. En el presente estudio se emplearon un total de ocho muestras de branquias, cuatro procedentes de individuos del grupo tratamiento (100.000 células/L durante 24 horas) y cuatro procedentes del grupo control.

- **Extracción de ARN y síntesis de ADNc**

El proceso de extracción de ARN se realizó en frío para evitar la degradación de éste. Las muestras de branquia se trituraron usando el homogenizador de tejidos Ultra-Turrax® (IKA, Staufen, DE). Posteriormente, se extrajo el ARN de dichas muestras con el kit NZYol (Nzytech, Lisboa, Portugal). Para ello, se añadió 1 mL del reactivo NZYol por cada 0,075 g de tejido. A continuación, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante cinco minutos y transcurrido ese tiempo se les añadió 0,2 mL de cloroformo por cada mL de NZYol utilizado, se agitaron en *vortex* y se incubaron dos minutos a temperatura ambiente. Una vez finalizado el período de incubación, las muestras se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 minutos a una temperatura de 4° C. Tras la centrifugación, la muestra se separó en tres fases, encontrándose el ARN en la fase acuosa superficial. Esta fase se retiró con extremo cuidado, con la finalidad de no arrastrar fases adyacentes que contaminaran la muestra de ARN. La fase que contiene el ARN se transfirió a un nuevo tubo y se precipitó el ARN añadiendo alcohol isopropílico e incubando la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a 12.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante resultante se retiró y se resuspendió el ARN con etanol 75 %. Las muestras se agitaron suavemente en el *vortex* y se centrifugaron a 7.500 x g durante cinco minutos a 4° C. Una vez finalizada la centrifugación, el precipitado resultante se dejó secar al aire y se resuspendió en agua libre de ARNasas. Las extracciones de ARN se conservaron en frío a -80 °C.

Una vez obtenida la muestra final, se cuantificó el ARN utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). También se comprobó la calidad e integridad del ARN mediante el bioanalizador de Agilent 2001 (Agilent Technologies, California, USA) en la unidad de biología molecular de los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña (UDC).

Posteriormente se realizaron alícuotas a una concentración de 100 ng/μL y se verificó el ajuste de la concentración mediante espectrofotometría.

- **Obtención de ADNc**

Una vez comprobada la calidad e integridad del ARN, se procedió a la síntesis del ADNc utilizando el kit *Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) en el termociclador *MyCycler* (BioRad, Hercules, USA).

Cada reacción inicial de síntesis constó de 1 μL de *oligo dT₁₈ primer* (0,5 μg/μL), 1 μL de *Random Hexamer Primer* (0,2 μg/μL) y 10 μL del ARN extraído en el paso anterior (100 ng/μL). La reacción inicial se incubó durante 10 minutos a 65 °C. Al finalizar los 10 minutos de incubación, se añadió 4 μL de *Reaction buffer (5X)*, 1 μL de *Ribolock RNase inhibitor* (20 U/μL), 2 μL de dNTP mix (10 nM) y 1 μL de *Revert Aid H. Minus M. Transcriptase* (200 U/μL) y se reanudó el programa de PCR según lo propuesto en el manual del kit *Revert Aid H Minus First Strandc DNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Al finalizar, las muestras se conservaron a -20° C.

- **Diseño de cebadores**

Teniendo en cuenta su implicación en procesos apoptóticos de invertebrados, en este trabajo se analizó la expresión de diversos genes de la familia de las caspasas en respuesta a toxinas DSP: caspasa 2 (HQ424449.1), caspasa 3/7-1 (HQ424451.1), caspasa 3/7-2 (HQ424452.1), caspasa 3/7-3 (HQ424453.1), caspasa 3/7-4 (HQ424454.1) y caspasa 8 (HQ424450.1). La secuencia de estos genes se encuentra disponible en el *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) , de donde se descargó. Utilizando el software de Roche *Universal Probe Library Assay Design Center*, sin seleccionar la opción de *Intrón Spanning Assay* y seleccionando la opción de *Differentiating Assays* (para que cada cebador fuera específico para cada gen), se diseñaron cebadores específicos para su amplificación.

- **PCR convencional**

Una vez diseñados los cebadores, se realizó una PCR convencional para validar la especificidad de los mismos mediante la comprobación del tamaño de los amplicones resultantes, así como de la ausencia de dímeros de cebadores. Para ello, se empleó ADNc sintetizado previamente.

Las amplificaciones también se realizaron en un termociclador *MyCycler* (BioRad, Hercules, USA), y la reacción constó de un calentamiento inicial de dos minutos a 94 °C y 35 ciclos formados por tres fases: una desnaturalización de 20 segundos a 94 °C, un

anillamiento de 30 segundos a 55 °C y una elongación de 30 segundos a 72 °C. Al finalizar estos 35 ciclos se realizó una extensión final de siete minutos a 72 °C.

Tras la finalización de la reacción, para visualizar el resultado de la amplificación se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 2% y el marcador Marker XIII (Roche Applied Science, Mannheim, DE).

- **Secuenciación**

Adicionalmente, para asegurarnos de que los cebadores no producían amplificaciones inespecíficas debido a las posibles semejanzas entre las secuencias de las caspasas estudiadas, los productos de PCR previamente obtenidos fueron secuenciados. Para llevar a cabo la reacción de secuenciación siguiendo el método Sanger, se purificaron los productos de PCR para eliminar restos de la reacción que pudieran intervenir con el proceso de secuenciación. Esta purificación se realizó con el *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Una vez se purificaron los productos de PCR éstos fueron secuenciados por Sistemas Genómicos (Valencia, España).

- **qPCR**

Mediante qPCR se estudió la expresión relativa de tres genes de la familia de las caspasas: caspasa 3/7-1 (HQ424451.1), caspasa 3/7-3 (HQ424453.1) y caspasa 3/7-4 (HQ424454.1), utilizando los genes rpS4 (proteína ribosomal S4, FL492874) y TPM (tropomiosina, AB000907.1) como referencia para la normalización de la expresión.

Las reacciones de qPCR se realizaron en una placa de 96 pocillos. La expresión de cada gen se evaluó empleando cuatro réplicas biológicas por condición experimental (control y tratamiento) y dos réplicas técnicas. Además, se incluyó un control negativo por cada gen cuantificado. La qPCR se llevó a cabo en un termociclador *Light Cycler 96® Real Time PCR System* (Roche Applied Science, Mannheim, DE) y se empleó el fluorocromo *SYBR Green* como agente intercalante, el cual se incluye en el *kit FastStart Essential DNA Green Master* (Roche Applied Science, Mannheim, DE). Para ello, se preparó la siguiente mezcla de reacción: 10 µL de *Light Cycler 480 SYBR Green I Master* (Roche Applied Science, Mannheim, DE), 0,8 µL de cada uno de los cebadores (*forward* y *reverse*) a una concentración de 10 µM, 6,4 µL de agua MilliQ autoclavada y 1,8 µL de ADNc a una concentración de 2 µg/µL sintetizado a partir de ARN de branquias de *M. galloprovincialis* control o tratamiento (100.000 células/L *P. lima* durante 24 horas).

Para llevar a cabo la qPCR se siguió un programa que consta primero de un ciclo de desnaturalización durante 10 minutos a 95 °C, seguido de 45 ciclos de amplificación. Cada ciclo constó de un primer paso de desnaturalización durante 10 segundos a 95 °C, posteriormente un anillamiento durante 10 segundos a 60 °C y por último la extensión durante 10 segundos a 72 °C.

- **Análisis de resultados**

Una vez finalizada la qPCR, los resultados obtenidos se exportaron y visualizaron a través del programa LightCycler[®]96 (versión 1.1.0.1320) (Roche Applied Science, Mannheim, DE). En este programa se realizaron los cálculos de la curva de *melting* para comprobar la especificidad de la reacción, y también se calculó el número de ciclos de amplificación necesarios para alcanzar el *quantification cycle* (Cq). Adicionalmente, se utilizó el programa LingRegPCR (versión 2017.1) para calcular la eficiencia de los cebadores en cada una de las reacciones (Ruijter *et al.*, 2009). Los valores de Cq y las eficiencias de amplificación obtenidas se emplearon para calcular las cuantificaciones relativas normalizadas (CRN) para cada gen, mediante el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Estos cálculos se llevaron a cabo utilizando una hoja de Excel (Microsoft Office, Washington, USA) previamente diseñada en el laboratorio. Posteriormente, se realizó un análisis estadístico para determinar diferencias de expresión génica entre condiciones (control y tratamiento) empleando el programa REST 2009 (versión 2.0.1.5) (Pfaffl *et al.*, 2002).

4. Resultados

- **Determinación de la integridad y cuantificación del ARN**

Los electroferogramas obtenidos mediante el bioanalizador mostraron elevada integridad para todas las muestras de ARN evaluadas (Figura 5). Aunque la relación entre los ARN ribosómicos (ARNr) 28S y 18S obtenida para todas las muestras mostró valores de RIN (*RNA Integrity Number*) entre 7,2 y 8,7, esto no significa que estos valores sean indicativos de una mala calidad. En el mejillón la fracción 28S del ARNr tiene un comportamiento electroforético diferente al marcador empleado por Agilent (Agilent Technologies, California, USA) (Barcia *et al.*, 1997), lo que dificulta su cuantificación y análisis. Sin embargo, la ausencia de ruido en la línea basal y la robustez del pico 28S indica ausencia de degradación y elevada integridad para todas las muestras de ARN extraídas.

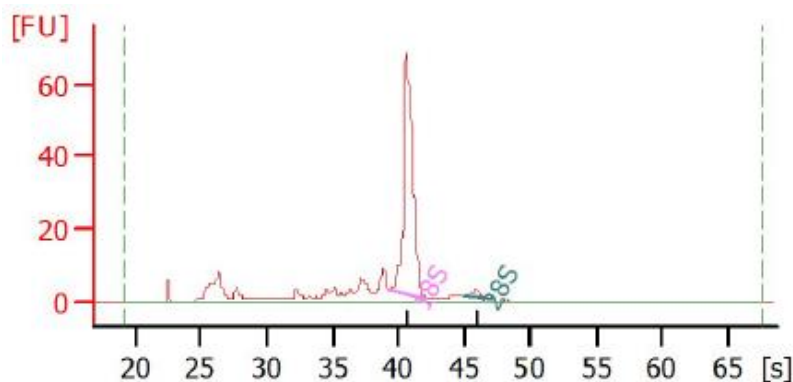


Figura 5: Electroferograma obtenido mediante el Bioanalizador de Agilent 2001 (Agilent Technologies, California, USA) para una de las muestras de ARN extraídas en el presente trabajo. FU: *Fluorescence Units*; s: segundos.

Por otra parte, los resultados obtenidos mediante espectrofotometría mostraron que todas las muestras poseían un ratio 260/280 superior a 2,00 y un ratio 260/230 superior a 1,7, lo que indica la ausencia de contaminantes (Tabla 1).

Muestra	260/280	260/230	Concentración ng/μL
MBC1	2,07	2,32	569,8
MBC2	2,11	2,27	1014,6
MBC3	2,08	2,29	698,5
MBC4	2,09	2,26	688,6
MBT1	2,07	1,77	1100,1
MBT2	2,09	1,72	949,0
MBT3	2,09	2,10	1002,1
MBT4	2,09	1,98	742,0

Tabla 1: Resultados de cuantificación inicial de las muestras de ARN obtenidos mediante el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). MBC: muestra branquia control, MBT: muestra branquia tratamiento.

- **Verificación de la especificidad de los cebadores**

Para la elección de los cebadores a utilizar en este estudio se tuvieron en cuenta los genes: caspasa 2 (HQ424449.1), caspasa 3/7-1 (HQ424451.1), caspasa 3/7-2 (HQ424452.1), caspasa 3/7-3 (HQ424453.1), caspasa 3/7-4 (HQ424454.1) y caspasa 8 (HQ424450.1). De todos ellos, dos (caspasa 2 y caspasa 3/7-2) no cumplieron los requisitos mínimos de especificidad para ser empleados en el presente trabajo. Las características del resto de cebadores diseñados se recogen en la Tabla 2.

Nombre	Ac.	Nº de ref.	A (Pb)	E	Cebadores (5'-3')
Caspasa 3/7-1	Casp 3/7-1	HQ424451.1	64	1,88	F: agagatccagaccaggcaga R: ttctccgaattcctctgca
Caspasa 3/7-3	Casp 3/7-3	HQ424453.1	66	1,89	F: tgctgttcggaactcctctt R: tttccttgattgactgtaaagact
Caspasa 3/7-4	Casp 3/7-4	HQ424454.1	65	1,90	F: ccacagttaattcttaagcccaaa R: tgtcttgagtcgggttctct
Caspasa 8	Casp 8	HQ424450.1	60	Sin datos	F: ttataccgatgaacagccaccta R: tccggtattgcaatctgtgat
Tropomiosina*	TPM	AB000907.1	65	1,93	F: gatgctgaaaaatcgtgcaac R: cggctactctttttgcaact
Proteína ribosomal S4*	rpS4	FL492874	121	1,92	F: tgggttatcgagggcgtag R: tccttagttgtgaggacctg

Tabla 2: Cebadores de cada uno de los genes utilizados en la PCR. *Genes de referencia. Ac.: Acrónimo. Nº de ref.: número de referencia. A: Amplicón. Pb: pares de bases. E: eficiencia. F: Forward. R: Reverse.

La caspasa 8 mostró amplificación en el control negativo, lo que evidencia fuerte dimerización de sus cebadores, por lo que estos cebadores no son apropiados para el estudio. En los casos de la caspasa 3/7-1 y 3/7-4 se ve una leve banda en el control negativo debida a la afinidad de una pequeña parte de la secuencia de los cebadores, con lo que en ausencia de ADN se produce la formación de una pequeña cantidad de dímero de cebador (Figura 6).

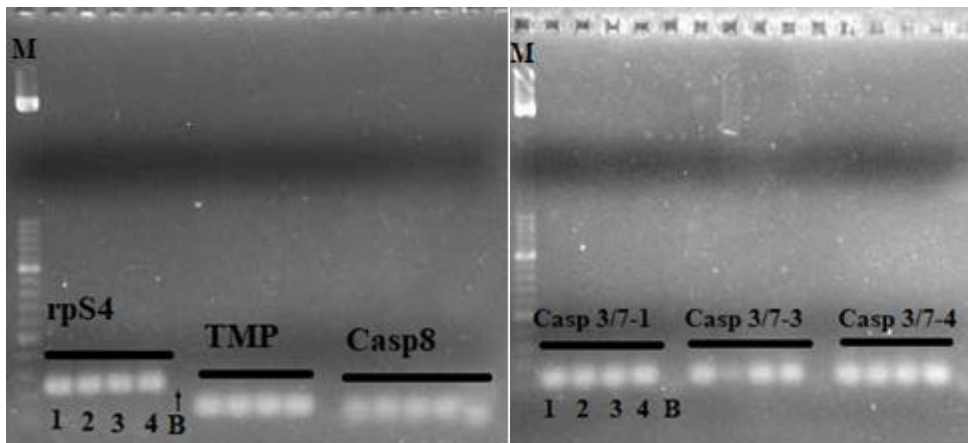


Figura 6: Gel de agarosa con los resultados de la PCR convencional. En la imagen se ven cuatro muestras por pareja de cebadores: 1: MBC1. 2: MBC2. 3: MBT1. 4: MBT2 y B: control negativo. M: marcador de peso molecular Marker XIII (Roche Applied Science, Mannheim, DE).

Con estos resultados obtenidos se decidió utilizar los cebadores correspondientes a la caspasa 3/7-1, caspasa 3/7-3 y caspasa 3/7-4.

- **Análisis de resultados**

Los valores de eficiencia obtenidos fueron superiores a 1,77 para todos los cebadores evaluados, indicando su buen funcionamiento en las reacciones de qPCR.

En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos con el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ en forma del valor medio del nivel de expresión relativa normalizado con respecto a los genes de referencia (rpS4 y TPM). Como podemos ver en la Figura 7A, el gen caspasa 3/7-1 se encuentra ligeramente sobreexpresado en las muestras tratamiento con respecto a las muestras control, en cambio la Figura 7B muestra una expresión del gen caspasa 3/7-3 menor en las muestras tratamiento que en las control. Por último en la Figura 7C podemos observar una sobreexpresión mayor en las muestras tratamiento que en las control del gen caspasa 3/7-4.

Aunque existen estas diferencias de expresión, las barras de error sugieren que estas no son diferencias significativas para ninguno de los tres genes.

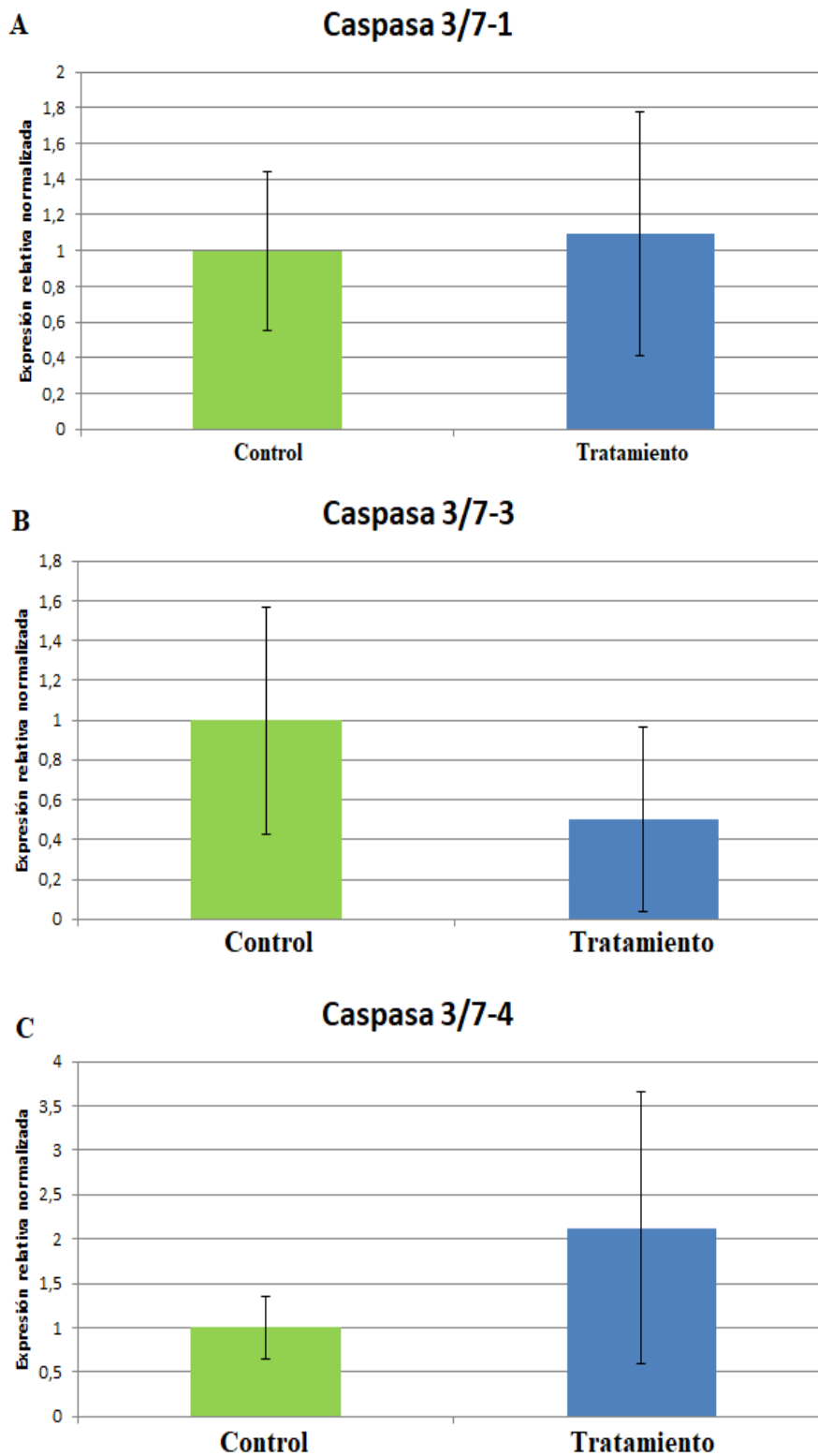


Figura 7: Gráficas A (caspasa 3/7-1), B (caspasa 3/7-3) y C (caspasa 3/7-4). En ellas se muestran los niveles medios de expresión relativa para los tres genes estudiados con respecto a los genes de referencia, obtenidos a través del método $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Las barras error expresan el margen potencial de error de cada uno de los niveles de expresión.

El análisis estadístico del estudio de la expresión génica dio como resultado p-valores > 0,05 (Tabla 3), lo que demuestra ausencia de diferencias de expresión génica significativa para todos los genes de caspasas analizados.

Gen	Tipo	Eficiencia de la reacción	Expresión	Error estándar	95% I.C.	P(H1)	Resultado
TPM	REF	0,9684	1,094				
rpS4	REF	0,965	0,914				
casp 3/7-1	TRG	0,9424	1,099	0,147 - 5,558	0,080 - 13,850	0,805	No diferencia
casp 3/7-3	TRG	0,949	0,483	0,053 - 2,114	0,037 - 19,456	0,359	No diferencia
casp 3/7-4	TRG	0,9513	2,184	0,397 - 7,815	0,317 - 29,301	0,153	No diferencia

Tabla 3: Resultados del análisis estadístico de las reacciones qPCR usando como genes de referencia rpS4 y TPM. REF: referencia. TRG: *target*. I.C: intervalo de confianza. P(H1): Probabilidad de la hipótesis alternativa.

5. Discusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyen al avance del conocimiento de la respuesta transcripcional temprana del mejillón gallego *M. galloprovincialis* a las toxinas DSP. Aunque inicialmente algunos estudios han propuesto que los genes de caspasas podrían estar implicados en los mecanismos de resistencia de los invertebrados contra las toxinas marinas (Romero *et al.*, 2011; Romero-Geraldo *et al.*, 2016; Yavaşoğlu *et al.*, 2016; de Boissel *et al.*, 2017), los resultados obtenidos en este estudio sugieren su desvinculación en la respuesta transcripcional temprana de la branquia de mejillón cuando ésta está expuesta a 100.000 células/L de *P. lima* durante 24 horas.

Contrariamente a los resultados obtenidos en este trabajo, el AO ha sido considerado causante de apoptosis o inhibición del crecimiento celular en diversos organismos tales como hámster chino y rata (Parameswaran *et al.*, 2004; Kitazumi *et al.*, 2010) y el ser humano (Leira *et al.*, 2001; Rossini *et al.*, 2001; Traoré *et al.*, 2001; Valdíglesias *et al.*, 2011). De modo similar, un estudio llevado a cabo en la ostra *Crassostrea gigas* evidenció la sobreexpresión diferencial de genes relacionados con el ciclo celular y la apoptosis, tales como p21 y p53 (Romero-Geraldo *et al.*, 2014). En bivalvos, el gen p21 está relacionado con las caspasas, ya que está regulado por p53 y éste a su vez, regulado por las caspasas. Además, esta sobreexpresión se observó cuando los organismos eran expuestos a *P. lima* durante 72 horas o más a una concentración de 3.000 cél./ mL, mientras que, coincidiendo con nuestros resultados, períodos de exposición menores no mostraron diferencias de expresión significativa (Romero-Geraldo *et al.*, 2014).

Previamente, otros autores detectaron sobreexpresión de las caspasas 3 y 9 cuando líneas celulares de mamíferos fueron expuestas a AO durante lapsos mayores de tiempo (Lago *et al.*, 2005; Ao *et al.*, 2008). Por todo ello, el factor tiempo parece ser clave en los cambios en la expresión de los genes relacionados con la apoptosis. Sin embargo, debemos señalar que estos estudios y resultados fueron obtenidos en células de mamíferos y, aunque el proceso de apoptosis se encuentra conservado en los seres vivos, no se puede hacer una relación lineal entre estos resultados y lo que ocurre en bivalvos. Otra posible explicación para la ausencia de diferencias de expresión génica

en las caspasas detectada en este trabajo, sería que la concentración de toxinas DSP (principalmente el AO) no haya sido lo suficientemente elevada para causar una expresión diferencial de las mismas (a mayor concentración de toxinas, mayor índice de apoptosis) (Parameswaran *et al.*, 2004).

Por otra parte, un efecto conocido del AO en las células de mamíferos es la activación de la caspasa 3 (Valdiglesias *et al.*, 2013). La caspasa 3 ha sido señalada como un componente importante de la apoptosis, pero parece que no es indispensable para que el proceso se lleve a cabo (Kitazumi *et al.*, 2010), por lo que su participación en la apoptosis todavía no está clara. Así, aunque los resultados obtenidos en el presente trabajo no muestran expresión génica diferencial significativa para los genes de las caspasas (caspasa3/7-1, caspasa 3/7-3 y caspasa 3/7-4), esto podría deberse a la activación de la apoptosis mediante un mecanismo independiente de la caspasa 3. Esto conllevaría que el proceso apoptótico tuviese lugar independientemente de la sobreexpresión diferencial de estos genes.

Otro factor a tener en cuenta es la posibilidad de que no sea necesario que todos los genes de las caspasas estén activos para que se lleve a cabo el proceso de apoptosis (Rossini *et al.*, 2001). También debemos destacar que el tejido de estudio, branquia, ha sido reportado en bivalvos como un tejido de gran resistencia a los contaminantes y la acumulación de toxinas en éste es relativamente baja (comparado con glándula digestiva) (Flórez-Barros *et al.*, 2011).

Manfrin *et al.* (2010), obtuvo que 9% los genes sobreexpresados en la glándula digestiva del mejillón *M. galloprovincialis*, expuesto a AO (6,5 µg cada tres días) a lo largo de cinco semanas, estaban relacionados con la apoptosis (factores inductores, reguladores y homólogos del protooncogen *C-myc*). Esto es un reflejo de la complejidad del proceso apoptótico.

Otros estudios sobre el transcriptoma de *M. galloprovincialis*, de su glándula digestiva expuesta a toxina PSP (Gerdol *et al.*, 2014), de glándula digestiva y branquia expuestas a toxina DSP (Suarez-Ulloa *et al.*, 2013; 2015) y glándula digestiva expuesta a toxina ASP (Pazos *et al.*, 2017), evidencian una gran variedad en los patrones de expresión.

Aún así, existen algunas evidencias sobre ciertas confluencias en los mecanismos de acción ante las toxinas, por ejemplo como es la expresión de secuencias que codifican para el dominio C1q (Venier *et al.*, 2009; Gerdol *et al.*, 2011). Este dominio está asociado a diversas funciones celulares como la apoptosis y la adhesión celular, entre otras (Gerdol *et al.*, 2011).

Debido a la gran complejidad y variabilidad de los factores que pueden influir en la respuesta ante las toxinas de *M. galloprovincialis*, es necesario un mayor estudio (variando las concentraciones de toxinas y tiempos de exposición) de los efectos que las HABs pueden producir. Para ello es indispensable el estudio del transcriptoma, para conseguir un mayor entendimiento sobre los mecanismos de respuesta y activación de las distintas caspasas.

6. a. Conclusión

Los genes de las caspasas: caspasa 3/7-1, caspasa 3/7-3 y caspasa 3/7-4 no mostraron diferencias de expresión génica significativas cuando las branquias de mejillones *M. galloprovincialis* fueron expuestas a 100.000 células/L del dinoflagelado productor de toxinas DSP *P. lima*.

6. b. Conclusion

Caspase genes: caspase 3/7-1, caspase 3/7-3 and caspase 3/7-4, did not show significant differential gene expression on gill cells of the mussel *M. galloprovincialis*, after treatment with 100,000 cells/L of the dinoflagellate *P. lima*, producer of DSP toxins.

6. c. Conclusión

Os xenes das caspasas: caspasa 3/7-1, caspasa 3/7-3 e caspasa 3/7-4 non mostraron diferenzas de expresión xénica significativas cando as branquias de mexillóns *M. galloprovincialis* foron expostas a 100.000 células/ L do dinoflagelado produtor de toxinas DSP *P. lima*.

7. Bibliografía

Ao, L., Liu, J., Gao, L., Liu, S., Yang, M., Huang, M. & Cao, J. (2008). Differential expression of genes associated with cell proliferation and apoptosis induced by okadaic acid during the transformation process of BALB/c 3T3 cells. *Toxicology in Vitro*, 22(1), 116–127. doi:10.1016/j.tiv.2007.08.013

Astuya, A., Carrera, C., Ulloa, V., Aballay, A., Núñez-Acuña, G., Hégaret, H. & Gallardo-Escárate, C. (2015). Saxitoxin modulates immunological parameters and gene transcription in *Mytilus chilensis* hemocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15235–15250. doi:10.3390/ijms160715235

Barcia, R., López-García, J. M. & Ramos-Martínez, J. I. (1997). The 28S fraction of rRNA in molluscs displays electrophoretic behaviour different from that of mammal cells. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 42(6), 1089–1092. doi:10.1080/15216549700203551

Bauder, A. G., Cembella, A. D., Bricelj, V. M. & Quilliam, M. A. (2001). Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Marine Ecology Progress Series*, 213, 39–52. doi:10.3354/meps213039

Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., ... Schoyen, M. (2017). Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. *Marine Environmental Research*, 130, 338–365. doi:10.1016/j.marenvres.2017.07.024

Bialojan, C. & Takai, A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochemical Journal*, 256(1), 283–290. doi:10.1042/bj2560283

Crocker, D. E., Khudyakov, J. I. & Champagne, C. D. (2016). Oxidative stress in northern elephant seals: Integration of omics approaches with ecological and experimental studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 200, 94–103. doi:10.1016/j.cbpa.2016.02.011

de Boissel, P. G. J., Fournier, M., Rodriguez-Lecompte, J. C., McKenna, P., Kibenge, F. & Siah, A. (2017). Functional and molecular responses of the blue mussel *Mytilus edulis* hemocytes exposed to cadmium - An in vitro model and transcriptomic approach. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 575–585. doi:10.1016/j.fsi.2017.06.001

Detree, C., Núñez-Acuña, G., Roberts, S. & Gallardo-Escárate, C. (2016). Uncovering the complex transcriptome response of *Mytilus chilensis* against saxitoxin: Implications of harmful algal blooms on mussel populations. *PLoS ONE*, 11(10), e0165231. doi:10.1371/journal.pone.0165231

Flórez-Barrós, F., Prado-Alvarez, M., Méndez, J. & Fernández-Tajes, J. (2011). Evaluation of genotoxicity in gills and hemolymph of clam *Ruditapes decussatus* fed with the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74(15–16), 971–979.

doi:10.1080/15287394.2011.582025

Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M. & Magnani, M. (2018). Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, *11*, 273. doi:10.1186/s13071-018-2859-8

Gerdol, M., De Moro, G., Manfrin, C., Milandri, A., Riccardi, E., Beran, A., ... Pallavicini, A. (2014). RNA sequencing and de novo assembly of the digestive gland transcriptome in *Mytilus galloprovincialis* fed with toxinogenic and non-toxic strains of *Alexandrium minutum*. *BMC Research Notes*, *7*, 722. doi:10.1186/1756-0500-7-722

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. *Journal of Invertebrate Pathology*, *131*, 137–154. doi:10.1016/j.jip.2015.05.007

Granéli, E. & Turner, J. (2006). *Ecology of harmful algae*. Heidelberg: Springer.

Huang, L., Liu, S., Zheng, J., Li, H., Liu, J. & Yang, W. (2015). P-glycoprotein and its inducible expression in three bivalve species after exposure to *Prorocentrum lima*. *Aquatic Toxicology*, *169*, 123–132. doi:10.1016/j.aquatox.2015.10.012

Kitazumi, I., Maseki, Y., Nomura, Y., Shimanuki, A., Sugita, Y. & Tsukahara, M. (2010). Okadaic acid induces DNA fragmentation via caspase-3-dependent and caspase-3-independent pathways in chinese hamster ovary (CHO)-K1 cells. *The FEBS Journal*, *277*(2), 404–412. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07493.x

Lago, J., Santaclara, F., Vieites, J. M. & Cabado, A. G. (2005). Collapse of mitochondrial membrane potential and caspases activation are early events in okadaic acid-treated Caco-2 cells. *Toxicon*, *46*(5), 579–586. doi:10.1016/j.toxicon.2005.07.007

Lassus, P., Chomérat, N., Hess, P. & Nézan, E. (2016). *Toxic and harmful microalgae of the world ocean*. Copenhagen: International Society for the Study of Harmful Algae.

Leira, F., Vieites, J. M., Vieytes, M. R. & Botana, L. M. (2001). Apoptotic events induced by the phosphatase inhibitor okadaic acid in normal human lung fibroblasts. *Toxicology in Vitro*, *15*(3), 199–208. doi:10.1016/S0887-2333(01)00013-3

Li, H., Liu, B., Huang, G., Fan, S., Zhang, B., Su, J. & Yu, D. (2017). Characterization of transcriptome and identification of biomineralization genes in winged pearl oyster (*Pteria penguin*) mantle tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, *21*, 67–76. doi:10.1016/j.cbd.2016.12.002

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, *25*(4), 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262

Manfrin, C., Dreos, R., Battistella, S., Beran, A., Gerdol, M., Varotto, L., ... Pallavicini, A. (2010). Mediterranean mussel gene expression profile induced by okadaic acid exposure. *Environmental Science & Technology*, *44*(21), 8276–8283. doi:10.1021/es102213f

Martín, R., García, T., Sanz, B. & Hernández, P. E. (1996). Biotoxinas marinas:

Intoxicaciones por el consumo de moluscos bivalvos. *Food Science and Technology International*, 2(1), 13–22. doi:10.1177/108201329600200102

Pabinger, S., Rödiger, S., Kriegner, A., Vierlinger, K. & Weinhäusel, A. (2014). A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomolecular Detection and Quantification*, 1(1), 23–33. doi:10.1016/j.bdq.2014.08.002

Parameswaran, N., Spielman, W. S., Brooks, D. P. & Nambi, P. (2004). Okadaic acid stimulates caspase-like activities and induces apoptosis of cultured rat mesangial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 260(1), 7–11. doi:10.1023/B:MCBI.0000026041.41078.32

Pazos, A. J., Ventoso, P., Martínez-Escauriaza, R., Pérez-Parallé, M. L., Blanco, J., Triviño, J. C., ... Sánchez, J.L. (2017). Transcriptional response after exposure to domoic acid-producing *Pseudo-nitzschia* in the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*. 2017;140:60–71. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.10.002.

Pfaffl, M. W., Horgan G. W. & Dempfle L. (2002). Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36. doi:10.1093/nar/30.9.e36

Pierce, B. A. (2009). *Genética: Un enfoque conceptual* (3^a ed.). Madrid: Editorial Médica Panamericana.

Prego-Faraldo, M. V., Valdiglesias, V., Laffon, B., Eirín-López, J. M. & Méndez, J. (2015). In vitro analysis of early genotoxic and cytotoxic effects of okadaic acid in different cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 78(13–14), 814–824. doi:10.1080/15287394.2015.1051173

Prego-Faraldo, M. V., Valdiglesias, V., Laffon, B., Méndez, J. & Eirín-López, J. M. (2016). Early genotoxic and cytotoxic effects of the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxins*, 8(6), 159. doi:10.3390/toxins8060159

Prego-Faraldo, M. V., Valdiglesias, V., Méndez, J. & Eirín-López, J. M. (2013). Okadaic acid meet and greet: An insight into detection methods, response strategies and genotoxic effects in marine invertebrates. *Marine Drugs*, 11(8), 2829–2845. doi:10.3390/md11082829

Reguera, B., Riobó, P., Rodríguez, F., Díaz, P. A., Pizarro, G., Paz, B., ... Blanco, J. (2014). *Dinophysis* toxins: Causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Marine Drugs*, 12(1), 394–461. doi:10.3390/md12010394

Romero, A., Estévez-Calvar, N., Dios, S., Figueras, A. & Novoa, B. (2011). New insights into the apoptotic process in mollusks: Characterization of caspase genes in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS ONE*, 6(2), e17003. doi:10.1371/journal.pone.0017003

Romero, A., Novoa, B. & Figueras, A. (2015). The complexity of apoptotic cell death in mollusks: An update. *Fish & Shellfish Immunology*, 46(1), 79–87. doi:10.1016/j.fsi.2015.03.038

- Romero-Geraldo, R. J., García-Lagunas, N. & Hernández-Saavedra, N. Y. (2014). Effects of in vitro exposure to diarrhetic toxin producer *Prorocentrum lima* on gene expressions related to cell cycle regulation and immune response in *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE*, 9(5), e97181. doi:10.1371/journal.pone.0097181
- Romero-Geraldo, R. J., García-Lagunas, N. & Hernández-Saavedra, N. Y. (2016). *Crassostrea gigas* exposure to the dinoflagellate *Prorocentrum lima*: Histological and gene expression effects on the digestive gland. *Marine Environmental Research*, 120, 93–102. doi:10.1016/j.marenvres.2016.07.011
- Romero-Geraldo, R. J. & Hernández-Saavedra, N. Y. (2014). Stress gene expression in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) in response to experimental exposure to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge, 1975. *Aquaculture Research*, 45(9), 1512–1522. doi:10.1111/are.12100
- Rossini, G. P., Sgarbi, N. & Malaguti, C. (2001). The toxic responses induced by okadaic acid involve processing of multiple caspase isoforms. *Toxicon*, 39(6), 763–770. doi:10.1016/S0041-0101(00)00202-6
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. B. & Moorman, A. F. M. (2009). Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37(6), e45. doi:10.1093/nar/gkp045
- Ruiz-Villarreal, M., García-García, L. M., Cobas, M., Díaz, P. A. & Reguera, B. (2016). Modelling the hydrodynamic conditions associated with *Dinophysis* blooms in Galicia (NW Spain). *Harmful Algae*, 53, 40–52. doi:10.1016/j.hal.2015.12.003
- Suárez-Ulloa, V., Fernández-Tajes, J., Aguiar-Pulido, V., Prego-Faraldo M. V., Flórez-Barros, F., Sexto-Iglesias, A., ... Eirín-López, J. M. (2015). Unbiased high-throughput characterization of mussel transcriptomic responses to sublethal concentrations of the biotoxin okadaic acid. *PeerJ*, 3, e1429. doi:10.7717/peerj.1429
- Suárez-Ulloa, V., Fernández-Tajes, J., Aguiar-Pulido, V., Rivera-Casas, C., González-Romero, R., Ausio, J., ... Eirín-López, J. M. (2013). The CHROMEVALOA database: A resource for the evaluation of okadaic acid contamination in the marine environment based on the chromatin-associated transcriptome of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Drugs*, 11(3), 830–841. doi:10.3390/md11030830
- 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. *Marine Drugs*, 11(11), 4370–4389. doi:10.3390/md11114370
- 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. *Animal Genetics*, 40(5), 663–677. doi:10.1111/j.1365-2052.2009.01894.x
- Traoré, A., Baudrimont, I., Ambaliou, S., Dano, S. D. & Creppy, E. E. (2001). DNA breaks and cell cycle arrest induced by okadaic acid in Caco-2 cells, a human colonic epithelial cell line. *Archives of Toxicology*, 75(2), 110–117.

doi:10.1007/s002040000188

Valdiglesias, V., Fernández-Tajes, J., Méndez, J., Pásaro, E. & Laffon, B. (2013). The marine toxin okadaic acid induces alterations in the expression level of cancer-related genes in human neuronal cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, 303–311. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.03.009

Valdiglesias, V., Laffon, B., Pásaro, E. & Méndez, J. (2011). Okadaic acid induces morphological changes, apoptosis and cell cycle alterations in different human cell types. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(6), 1831–1840. doi:10.1039/C0EM00771D

Valdiglesias, V., Prego-Faraldo, M. V., Pásaro, E., Méndez, J. & Laffon, B. (2013). Okadaic acid: More than a diarrheic toxin. *Marine Drugs*, 11(11), 4328–4349. doi:10.3390/md11114328

Venier, P., De Pittà, C., Bernante, F., Varotto, L., De Nardi, B., Bovo, G., ... Lanfranchi, G. (2009). MytiBase: A knowledgebase of mussel (*M. galloprovincialis*) transcribed sequences. *BMC Genomics*, 10, 72. doi:10.1186/1471-2164-10-72

Venier, P., Varotto, L., Rosani, U., Millino, C., Celegato, B., Bernante, F., ... Pallavicini, A. (2011). Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics*, 12, 69. doi:10.1186/1471-2164-12-69

Wang, Z., Shao, Y., Li, C., Zhang, W., Duan, X., Zhao, X., ... Jin, C. (2016). RNA-seq analysis revealed ROS-mediated related genes involved in cadmium detoxification in the razor clam *Sinonovacula constricta*. *Fish & Shellfish Immunology*, 57, 350–361. doi:10.1016/j.fsi.2016.08.051

Xunta de Galicia. (2017). *Anuario de acuicultura 2017*. Recuperado de <https://www.pescadegalicia.gal/Publicaciones/AnuarioAcuicultura2017/indice.html>

Yavaşoğlu, A., Özkan, D., Güner, A., Katalay, S., Oltulu, F. & Ülkü Karabay Yavaşoğlu, N. (2016). Histopathological and apoptotic changes on marine mussels *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) following exposure to environmental pollutants. *Marine Pollution Bulletin*, 109(1), 184–191. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.05.084