

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
ÁREA DE GENÉTICA

**IDENTIFICACIÓN DE GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE
EN EL MEJILLÓN *Mytilus galloprovincialis*, A PARTIR DE
GENOTECAS DE SUSTRACCIÓN**

Grado en Biología

Curso académico 2012/2013

Trabajo de Fin de Grado presentado por
IARA M^a PÉREZ TABOADA



TRABALLO FIN DE GRAO

D/Dña JOSEFINA MENDEZ FELPETO autorizo a presentación do Traballo de Fin de Grao **“Identificación de genes expresados diferencialmente en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, a partir de genotecas de sustracción”** presentado por Dña IARA M^a PÉREZ TABOADA para a súa defensa ante o tribunal cualificador.

En A Coruña, a 10 de Junio de 2013

Asdo.: JOSEFINA MENDEZ FELPETO

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1. <i>Blooms</i> algales nocivos, toxinas DSP | 1 |
| 1.1. Ocurrencia, organismos productores, ácido okadaico | 1 |
| 1.2. Toxicología | 3 |
| 1.3. Detección..... | 3 |
| 2. Monitorización ambiental, biomarcadores | 3 |
| 2.1. Organismos centinela: moluscos bivalvos..... | 4 |
| OBJETIVO..... | 6 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 7 |
| 1. Material objeto de estudio | 7 |
| 2. Extracción de RNA, purificación, cualificación y aprobación de la pureza | 7 |
| 3. Síntesis cDNA | 7 |
| 4. Selección de genes para PCR en tiempo real y diseño de <i>primers</i> | 8 |
| 5. Evaluación de la eficacia de <i>primers</i> mediante PCR..... | 8 |
| 6. Electroforesis en gel de agarosa | 8 |
| 7. Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real | 8 |
| RESULTADOS | 11 |
| 1. Selección de secuencias y diseño de <i>primers</i> | 11 |
| 2. Evaluación de la eficacia de <i>primers</i> mediante PCR..... | 12 |
| 3. Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real | 13 |
| DISCUSIÓN..... | 15 |
| CONCLUSIONES..... | 18 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 19 |
| ANEXO | 21 |

INTRODUCCIÓN

1. Blooms algales nocivos, toxinas DSP

Los blooms algales son uno de los fenómenos más importantes de contaminación natural del medio marino. Constituyen eventos de rápido aumento o acumulación de una población de fitoplancton en el medio. Alrededor de 60 especies de dinoflagelados y diatomeas implicados en estos fenómenos producen ficotoxinas, provocando los llamados blooms algales nocivos o HABs (*Harmful Algal Blooms*) (Gerssen *et al.*, 2010). En un principio se denominaron como mareas rojas (Figura 1) ya que se producían por dinoflagelados con pigmentos de este color, pero también pueden ser verde, amarillo o azul, dependiendo de los organismos implicados (Pettersson y Pozdnyakov, 2013).



Figura 1: Imagen (Woods Hole Oceanographic Institution, WHOI, 2007): Marea roja no tóxica de *Noctiluca scintillans* en Nueva Zelanda.

Las explicaciones de estos *blooms* no están completamente comprendidas aunque parece que las condiciones climáticas e hidrográficas juegan un papel importante (Gerssen *et al.*, 2010).

Las toxinas marinas producidas por dinoflagelados y diatomeas suelen ser metabolitos secundarios en estos organismos sin una función concreta pero que podrían ayudar al organismo en la competencia por el espacio, ante depredadores o ante aumentos excesivos de población de otros organismos (Pettersson y Pozdnyakov, 2013).

La salud humana puede verse seriamente afectada por estas toxinas debido al consumo de organismos marinos “contaminados”, como es el caso de los mejillones, en los que la toxina se acumula sin provocarles la muerte. Las consecuencias también afectan a las economías locales debido a pérdidas en industrias de acuicultura, industrias de recreo o turismo (Pettersson y Pozdnyakov, 2013).

Las toxinas producidas en estos episodios se pueden clasificar en dos grandes categorías: las toxinas hidrofílicas y las lipofílicas. Dentro de las mismas, se agrupan según la intoxicación causada al ser ingeridas y su estructura química (Gerssen *et al.*, 2010). Son responsables de los síndromes amnésico (ASP), paralítico (PSP), neurotóxico (NSP) o diarreico (DSP) así como síndromes causados por azaspirácidos y ciguatoxina. En este trabajo se consideran las toxinas de intoxicación diarreica (DSP, *Diarrheic Shellfish Poisoning*), las cuales son las principales responsables de los episodios tóxicos en Galicia.

1.1. Ocurrencia, organismos productores, ácido okadaico

Lo que parece la primera evidencia de una intoxicación por toxinas DSP se remonta a 1961, debida a unos mejillones procedentes de Holanda. No fue, sin embargo, hasta 1976 cuando se identificaron en Japón los dos géneros de dinoflagelados (*Dinophysis* y *Prorocentrum*) asociados a esta patología que afectó a 42 personas (Escudeiro-Rossignoli, 2013). A raíz de este y nuevos descubrimientos, se empezaron a identificar nuevos episodios causados por toxinas DSP en otras partes del mundo. Actualmente, la distribución de los organismos productores de estas toxinas es bastante más amplia a nivel mundial, especialmente en Europa, donde existe una tendencia al aumento de episodios HABs (Figura 2).

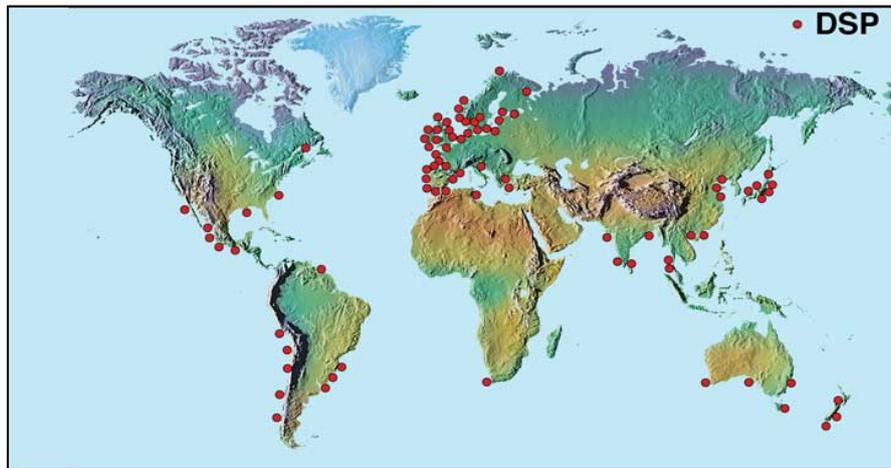


Figura 2: Distribución geográfica de la presencia de toxinas DSP (WHOI, 2007).

Como se puede observar en el mapa, España se encuentra bastante afectada, especialmente la zona noroeste en la que estos fenómenos son comunes a lo largo de todo el año y donde se encuentran los mayores productores de productos de alimentación del mar. Galicia es la comunidad autónoma española con las tasas más elevadas de producción de mejillón, las más de 3300 bateas que existen dedicadas al cultivo de este molusco, han situado a España como segundo productor mundial después de China (Consejo Regulador de la Denominación de Origen del Mejillón de Galicia, 2012).

Los principales organismos asociados a estos episodios son dinoflagelados del género *Dinophysis* (*D. acuminata*, *D. fortii*, *D. acuta*, *D. novergica*, *D. mitra*, *D. Rotundata*) y *Prorocentrum* (*P.lima*, *P.belizeanum*, *P.maculosum*) (Figura 3). En Galicia, las principales especies responsables son del género *Dinophysis*, especialmente *D.acuminata* y *D.acuta*, aunque varían de unas rías a otras (Flórez-Barrós, 2012; Escudeiro-Rossignoli, 2013).



Figura 3: Organismos causantes del síndrome DSP: *Prorocentrum lima* (izquierda) y diversas especies del género *Dinophysis* (derecha) (WHOI, 2007).

El ácido okadaico (OA) es el principal compuesto entre las toxinas diarreas (DTX). En general, las DTX son compuestos poliéter termoestables y lipofílicos, con una cadena de 38 carbonos y se diferencian principalmente en la posición o número de los grupos metilo que contienen (C31-C35) (Figura 4).

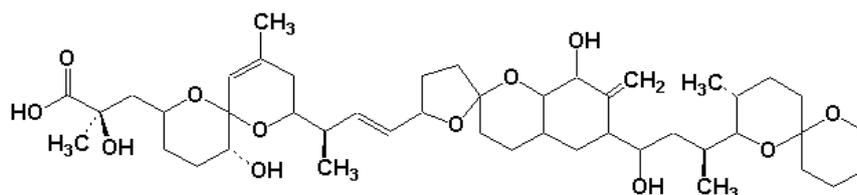


Figura 4: Estructura química del ácido okadaico (OA).

El OA fue aislado por primera vez de esponjas del género *Halichondria* y fue identificado como tal por Murata y colaboradores en 1982 (Fernández *et al.*, 2002; Escudeiro-Rossignoli, 2013).

1.2. Toxicología

El OA en el medio marino es acumulado en tejidos de organismos como los moluscos bivalvos. La posterior ingesta de los mismos provoca, entre 30 minutos o unas horas después, diarrea y otros síntomas como náuseas, vómitos y dolor abdominal, que desaparecen transcurridos 3 días. Aunque estos síntomas generalmente son leves, se ha indicado que también puede causar tumores en el aparato digestivo si el consumo de moluscos afectados es continuado (López-Rodas *et al.*, 2006). Actualmente existen diferentes líneas de trabajo sobre este tema y los resultados resultan a veces contradictorios (Munday, 2013).

Su modo de acción consiste en inhibir las fosfatasa serina/treonina, especialmente las fosfatasa 1 (PP1) y 2A (PP2A), que están relacionadas con funciones enzimáticas de desfosforilación de residuos de fosfoserina y fosfotreonina de sustratos proteicos, influyendo en la regulación del metabolismo celular, replicación del DNA, transcripción, ciclo celular, diferenciación, desestabilización genómica y oncogénesis. Se cree que esta inhibición es la responsable de los efectos derivados del OA aunque esta relación directa no está completamente demostrada. La diarrea viene dada por la hiperfosforilación derivada de la falta de actividad de estas fosfatasa, alterando la secreción de Na⁺ y la permeabilidad de fluidos de células intestinales (Fernández *et al.* 2002; Munday, 2013).

1.3. Detección

La Unión Europea establece una legislación que no permite la comercialización de las especies afectadas cuando los niveles de OA por cada kg de peso seco de marisco estén por encima de 160 µg (Comisión Europea, 2004).

La UE también establece un método de detección principal de niveles de OA en tejidos de molusco. Es un bioensayo *in vivo* que puede ser realizado con ratón o rata a los que se les inyecta una preparación de la toxina. La muerte de dos de tres ratones en un período de 24 horas después de la inoculación de un extracto equivalente a 5g de bivalvo será un resultado positivo de sobrepaso de los niveles permitidos (Comisión Europea, 2013). Sin embargo, este bioensayo conlleva una serie de problemas, ya que es un método caro y que requiere bastante tiempo, es poco específico y no distingue entre toxinas o grupos, además pueden surgir contratiempos en otros aspectos como el mantenimiento de ratones en el laboratorio.

Además de métodos de detección *in vivo*, como el anterior, existen otras alternativas como ensayos *in vitro*, métodos bioquímicos y métodos químicos pero todas ellas presentan diversos inconvenientes (Gerssen *et al.*, 2010). Así los métodos de detección de toxinas todavía deben mejorarse, haciendo que sean lo más fácil y rápidamente aplicables, específicos, sensibles y económicos.

2. Monitorización ambiental, biomarcadores

En este sentido, las técnicas moleculares representan un gran avance que además proporcionan una mejor comprensión de lo que sucede en un proceso de contaminación, pues las interacciones con organismos ocurren inicialmente a nivel molecular, evitando el tener que esperar un efecto del contaminante visible en el ecosistema. Estas reacciones pueden usarse para diseñar herramientas bioanalíticas específicas de monitorización ambiental con el fin de detectar procesos de contaminación (Eggen *et al.*, 2004). Así surgen lo que se conoce como biomarcadores, que son medidas a nivel molecular, celular o del organismo completo, de la exposición a tóxicos (biomarcadores de exposición), o de la respuesta de ese organismo a los contaminantes (biomarcadores de efecto) (Livingstone, 1993; Fernández-Tajes *et al.*, 2010).

Existen diversas ventajas derivadas del uso de biomarcadores. La naturaleza molecular de la mayoría de ellos hace que en muchos casos puedan ser aplicados en varios organismos y, consecuentemente, en lugares con diferente biota. Esto puede ayudar a dilucidar la importancia de las diferentes rutas de exposición ayudando a priorizar esquemas de monitorización y sugiriendo estrategias de acción, extrapolables al medio natural (Eggen *et al.*, 2004). El hecho de que puedan ser detectados en un corto plazo como señal de interacción entre el contaminante y el organismo permite evaluar los efectos subletales, que proporcionan una señal de advertencia para llevar a cabo

acciones preventivas inmediatas, pudiéndose desarrollar estrategias de biorremediación (Livingstone, 1993).

Entre las medidas moleculares que se pueden incluir como biomarcadores se encuentran aquellas relacionadas con la genómica de los organismos empleados, siendo la expresión diferencial de genes una de las respuestas a una intoxicación. A partir de la aparición de las nuevas plataformas NGS (*Next-Generation Sequencing*) de secuenciación masiva, los métodos de secuenciación genómica han pasado a ser mucho más fáciles, baratos y rápidos, haciendo posible el análisis de estas interacciones entre genética y ambiente.

2.1. Organismos centinela: moluscos bivalvos

Una de las dudas que surge con la aplicación de biomarcadores son las especies que se deben elegir para su desarrollo. Estas especies constituyen lo que se llama bioindicadores, indicadores de bioacumulación, biomonitores u organismos centinela, y deben cumplir unas determinadas características.

Una decisión de muchos científicos marinos es emplear moluscos bivalvos como organismo centinela, concretamente mejillones comunes (familia Mytilidae: *Mytilus edulis*, o *M.galloprovincialis*). Las razones que hacen a estos organismos idóneos como bioindicadores son que son organismos cosmopolitas, fácilmente identificables, sedentarios, presentan tamaños de población local estables y amplios y son comercial y ecológicamente valiosos (Farrington *et al.*, 1987). Además, como ya se ha comentado, la toxina se acumula en sus tejidos sin causarles la muerte, lo que se encuentra ligado a su gran potencial de detoxificación. Por tanto, el estudio de los procesos desencadenados por el OA tras su entrada en el mejillón y, consecuentemente, el patrón de expresión genética ante esta toxina permite comprender mejor lo que sucede en este proceso y, finalmente, desarrollar biomarcadores de contaminación a partir de esta información.

El mejillón gallego *M.galloprovincialis* es un organismo muy estudiado a nivel ecológico, anatómico, morfológico y de cultivo. No obstante, los estudios genéticos se han visto más reducidos debido a que estos organismos no poseen las características de un organismo modelo, encontrándose actualmente su genoma sin secuenciar. Así, las herramientas más utilizadas para su estudio están asociadas a su transcriptoma, del que cada vez se conoce más (Venier *et al.*, 2003; Venier *et al.*, 2006; Tanguy *et al.*, 2008; Flórez-Barrós, 2012). Una de las metodologías más empleadas es la elaboración de genotecas a partir del cDNA. Con el empleo de estas técnicas ha habido últimamente iniciativas que resultan prometedoras, como la base de datos CHROMEVALOA, nacida con la intención de servir como recurso para la evaluación y monitorización de la contaminación por OA del medio marino basándose en el transcriptoma asociado a cromatina del mejillón *M.galloprovincialis* (Suárez-Ulloa *et al.*, 2013). Así como el reciente desarrollo de biomarcadores de exposición a metales pesados relacionados con el daño en el DNA y cambios en la maquinaria de transcripción en esta misma especie (Varotto *et al.*, 2013).

Concretamente, las genotecas de hibridación sustractiva o de sustracción (*Supression Subtractive Hybridization*, SSH) son una metodología eficaz para seleccionar genes expresados diferencialmente, en especial cuando la información acerca de los transcriptomas de estudio es escasa. Esta técnica fue presentada por Diatchenko *et al.* en 1996 y se basa en la combinación de normalización y sustracción en un mismo procedimiento, revelándose como una estrategia muy eficiente para la identificación de genes diferencialmente expresados en distintos procesos o tejidos. El paso de normalización iguala la abundancia de cDNA en la población que nos interesa y el paso de sustracción excluye las secuencias compartidas entre la población control y la de interés. Así, se pueden observar los genes que aparecen diferencialmente expresados en la población de interés respecto a la control. Tras esto, se pueden emplear herramientas como la PCR cuantitativa a tiempo real que nos permite comprobar y estudiar estos perfiles de expresión diferencial revelando los genes y, consecuentemente, las rutas metabólicas o procesos celulares, implicados y desregulados en la respuesta a una toxina, a partir de los que se pueden obtener biomarcadores de contaminación marina.

Este trabajo se engloba dentro de los proyectos de investigación llevados a cabo por el grupo XENOMAR de la Universidade da Coruña. El proyecto del que deriva tiene por objeto el estudio de mecanismos genéticos implicados en la respuesta de las células de *M.gallopvncialis* ante el OA pudiendo así identificar posibles biomarcadores de contaminación temprana. En este proyecto se realizaron, entre otras, 4 genotecas de sustracción: 2 de branquia y 2 de hepatopáncreas, en ambos casos una procedía de individuos tratados con bajas concentraciones del dinoflagelado *P.lima* (200 cél/mL), productor de la toxina OA, durante 1 día, y la otra de individuos control no tratados. Tras la secuenciación y análisis de estas genotecas se obtuvieron diversas secuencias con varias categorías funcionales diferencialmente expresadas en alguna de ellas. Aquellas que presentaban una sobrerrepresentación importante en alguna de las genotecas o se encontraban relacionadas con el metabolismo, la detoxificación o el citoesqueleto fueron analizadas posteriormente mediante PCR en tiempo real. En este trabajo, se seleccionaron otras secuencias también sobrerrepresentadas o relacionadas con procesos metabólicos importantes de las genotecas de sustracción tratada y control no analizadas hasta el momento para el estudio de su patrón de sobreexpresión o represión mediante PCR en tiempo real.

OBJETIVO

La finalidad principal de este trabajo es el estudio de la expresión diferencial de genes en branquia y hepatopáncreas del mejillón *M.galloprovincialis* como respuesta a la exposición a la toxina OA producida por el dinoflagelado *P.lima*. De esta forma se pretende contribuir al estudio de posibles biomarcadores de contaminación temprana que podrán ser caracterizados más a fondo con el fin de usarlos en estudios de monitorización ambiental. Además, constituye un paso adelante en proyectos globales del grupo XENOMAR, ampliando nuestro conocimiento del mejillón y su transcriptoma.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material objeto de estudio

Los ejemplares de mejillón (*M. galloprovincialis*) empleados en el presente estudio se recolectaron de una población natural de roca no contaminada de la playa de Valcobo (A Coruña) y se mantuvieron en tanques de 20 L durante 1 día en condiciones naturales de fotoperiodo, temperatura (18 °C) y oxigenación (> 90%). Estas muestras fueron divididas en dos grupos, un grupo control, que fue alimentado 3 veces al día con algas de las especies *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suecica*, y un grupo tratado, que además fue alimentado con el dinoflagelado productor de OA *P. lima* (a concentraciones de 200 cél/mL y 20000 cél/mL) durante 1 día.

2. Extracción de RNA, purificación, cualificación y aprobación de la pureza

Para la extracción del RNA, la branquia y el hepatopáncreas correspondientes a *pools* de 10 individuos fueron previamente diseccionadas en frío y pulverizados en un mortero con la adición de nitrógeno líquido. El pulverizado resultante fue depositado en tubos Falcon añadiendo la cantidad de Trizol (Trizol Reagent, Invitrogen) recomendada por el fabricante. Para cada tejido se empleó 1 *pool* de individuos control, 2 *pools* de individuos tratados con *P.lima* a una concentración de 200 cél/mL durante 1 día y 2 *pools* de individuos tratados con *P.lima* a una concentración de 20000 cél/mL durante 1 día.

Para comenzar se realizaron dos extracciones de cada tubo Falcon, pasando 1 mL de contenido a tubos Eppendorf de 1,5 mL que se centrifugaron a 12000 xg durante 10 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante en nuevos tubos y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Pasado ese tiempo se añadió 0,2 mL de cloroformo en cada tubo y se agitó en vórtex 15 segundos. La mezcla se dejó incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente y después se centrifugó a 12000 xg durante 5 minutos y a 4°C.

Tras esta centrifugación se observó una fase rojiza de fenol-cloroformo y una telilla blanquecina separándola de una fase superior acuosa, que contenía el RNA. Esta última se transfirió a tubos Eppendorf limpios donde se llevó a cabo una precipitación del RNA añadiendo 0,5 mL de isopropanol frío. Se realizó una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron los tubos a 12000 xg durante 10 minutos a 4°C. Eliminamos el sobrenadante resultante y añadimos 1 mL de etanol al 75% al *pellet* que contenía el RNA precipitado, mezclamos con vórtex y centrifugamos a 7500 xg durante 5 minutos a 4°C.

Se eliminó el sobrenadante y los restos de etanol con una pipeta y se dejó secar a temperatura ambiente. El *pellet* se resuspendió en 100 µL de agua Milli-Q autoclavada libre de RNasas y se incubó durante 10 minutos a 60°C para ayudar a la resuspensión.

Para asegurar que el RNA era de una buena calidad se hizo un paso más de precipitación con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M, pH 5 y 2,5 volúmenes de etanol al 100% frío. Se mezcló y se dejó a -20°C toda la noche.

Al día siguiente se centrifugó a 12000 xg durante 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se hicieron dos lavados de etanol al 75% como los descritos anteriormente. Posteriormente, se comprobó la calidad del RNA extraído mediante el Nanodrop™ 1000 (Thermo Scientific) controlando que el ratio A 260/280 se encontraba entre 1,8 y 2 y el ratio A 260/230 era de 1,8 o mayor para todas las muestras.

3. Síntesis cDNA

La obtención de cDNA para la PCR en tiempo real se realizó a partir de 1 µg de RNA total empleando el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche Applied Science) con el que se obtienen moléculas de DNA de cadena simple que pueden ser usadas directamente para PCR en tiempo real. De las opciones que ofrece este kit, se empleó el sistema de *priming* con oligo-dT *primer* (que se une a la cola poly(A) del RNA) y *random primers* (que se unen a lo largo de toda la extensión del RNA para evitar problemas de sobrerrepresentación, especialmente con los extremos 5'), la más

recomendada para PCR en tiempo real por su alta sensibilidad. Posteriormente se realizó la cualificación del cDNA sintetizado mediante el Nanodrop™ 1000 (Thermo Scientific) controlando que el ratio A260/280 estuviera alrededor de 1.8 y su cuantificación, comprobando que todas las muestras tuvieran la misma concentración de cDNA.

4. Selección de genes para PCR en tiempo real y diseño de primers

De las 4 genotecas de sustracción disponibles en el laboratorio, procedente de estudios anteriores, se seleccionaron un total de 7 secuencias (3 correspondientes a las genotecas de branquia y 4 de las de hepatopáncreas) para su análisis mediante PCR en tiempo real. Se eligieron aquellos ESTs (*Expressed Sequence Tags*) procedentes de genotecas de individuos alimentados con 200 cél/mL de *P.lima* durante 1 día que, en el análisis realizado en 2010 con Blast2GO, correspondieron con ESTs muy abundantes en alguna de las genotecas o relacionados con algún tipo de función molecular, componente celular o proceso biológico interesante. Los ESTs elegidos fueron los siguientes: *isoform cra_c*, *rapunzel 5* y *pancreatic triacylglycerol lipase* en branquia; *long chain acyldehydrogenase*, *sialic acid acetylerase*, *v-myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)* y *n-(beta-n-acetylglucosaminy)-asparaginase* en hepatopáncreas.

Se diseñaron *primers* específicos para cada una de las secuencias empleando la aplicación *Universal Probe Library* (<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=UP030000>) de Roche Applied Science (al igual que el equipo de PCR en tiempo real empleado posteriormente) cuando fue posible. Cuando no se obtuvieron resultados satisfactorios se empleó la herramienta *Primer 3* (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Los *primers* fueron virtualmente probados en la aplicación *In silico PCR amplification* (<http://insilico.ehu.es/PCR/>).

5. Evaluación de la eficacia de primers mediante PCR

Antes de llevar a cabo la PCR en tiempo real se realizó una prueba de los *primers* mediante una PCR convencional para comprobar la amplificación de la secuencia deseada, escogiendo tres muestras diferentes para cada gen (control, tratada con 200 cél/mL y tratada con 20000 cél/mL).

Para ello se empleó la enzima polimerasa *hot start* TaKaRa Taq™ (Clontech), preparando la reacción para un volumen final de 25 µL con las siguientes concentraciones: *buffer* 1X, dNTPs 0,2 mM, Mg⁺² 1,5 mM, *primers* 0,4 µM, polimerasa *Taq* 1U y una cantidad de 2 µg de cDNA.

6. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2,5% a 80V empleando como marcador de peso molecular el *DNA Molecular Weight Marker XIII* (Roche Applied Science) y visualizando el gel con el equipo Molecular Imager® Gel Doc™ XR (BIO-RAD) y el *software* asociado, tras tñirlo con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg /mL durante 15 minutos.

7. Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa se basa en la amplificación exponencial de un fragmento específico, empleado como molde para generar millones de copias. La PCR a tiempo real se diferencia de la PCR clásica en que permite monitorizar en cada ciclo la aparición del DNA producto de la reacción, mediante fluorocromos. Cada vez que se realiza una copia del DNA molde se libera fluorescencia, que será proporcional a la cantidad de DNA generado. Es una técnica precisa, de alto rendimiento y relativamente sencilla (Higuchi *et al.*, 1993).

El resultado de esta PCR se puede ver en un gráfico de amplificación, generado por el *software* conectado con el aparato de amplificación, que muestra la fluorescencia leída por el termociclador en el eje de las ordenadas y el número de ciclos en el eje de abscisas. Así se distinguen tres fases en la curva, entre la primera y la segunda se puede establecer un valor de fluorescencia umbral (*Threshold*) a partir del que comienza el aumento exponencial (Figura 5).

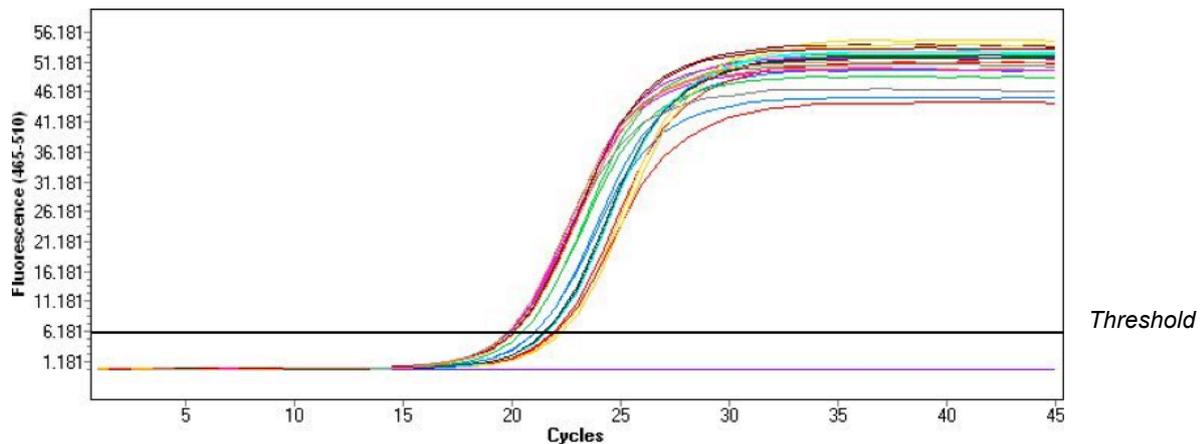


Figura 5: Gráfica de PCR en tiempo real marcando la línea de *Threshold*.

Hay dos métodos de detección por fluorescencia que pueden usarse en PCR en tiempo real. En la forma más simple se emplea un agente intercalante, como el SYBR® Green. Éste se une al surco menor del DNA de doble cadena y, bajo excitación, emite fluorescencia. Así, si es incluido en la reacción, la fluorescencia aumenta con la acumulación de producto de PCR (Figura 6) (Reece, 2004).

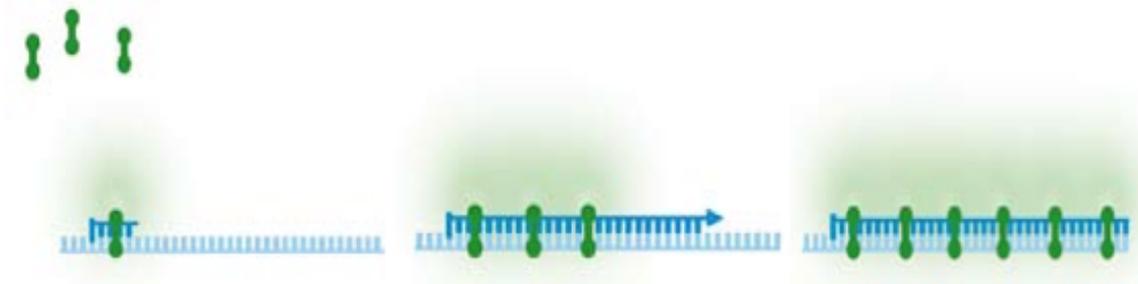


Figura 6: Proceso de unión de SYBR Green a DNA durante la amplificación mediante PCR en tiempo real (Roche Applied Science, 2008).

Las ventajas de este método incluyen que no es muy caro, es fácil de usar y sensible. Su desventaja principal es que se une a cualquier DNA de doble cadena presente en la reacción, como *primer dimers* u otros productos inespecíficos. Esto puede solucionarse mediante el análisis de la curva de *melting*. La temperatura de *melting* (T_m) de un producto de PCR depende de su tamaño y composición nucleotídica, por lo que se puede distinguir la señal del producto buscado de aquellos cuya T_m es menor y, por tanto, inespecíficos (Reece, 2004) (Figura 7).

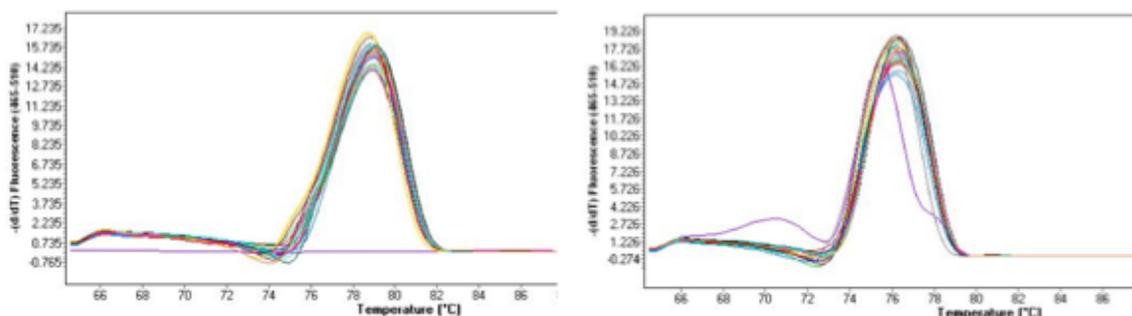


Figura 7: Gráficas de T_m mostrando la diferencia cuando no existen productos inespecíficos (izquierda) y cuando sí existen (derecha).

En el caso de las sondas específicas, éstas están unidas a dos fluorocromos, uno donador y otro aceptor y se basan en el incremento de fluorescencia de ambos debido a la transferencia de energía fluorescente por resonancia (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Las más empleadas son sondas TaqMan, *Molecular Beacons* y sondas *Scorpion* (Reece, 2004).

El estudio de expresión de los genes seleccionados en este estudio se llevó a cabo mediante PCR cuantitativas a tiempo real en el equipo *Light Cycler 480 Real-Time PCR System* (Roche Applied Science) del servicio de genómica y proteómica del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña.

Las placas se diseñaron de forma que cada muestra contaba con una réplica y se incluyó un control negativo para cada gen, así como un gen de referencia en cada una de las placas con sus correspondientes réplicas.

La forma elegida de monitorización fue mediante la medida de la señal fluorescente del agente intercalante SYBR Green. Por tanto, la mezcla de reacción se compuso de 10 μ l LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science), 1 μ L de cada *primer* a una concentración de 10 μ M, 6,5 μ L de agua Milli-Q autoclavada y 1,5 μ L de cDNA en una concentración de 2 μ g/ μ L procedente de branquia o hepatopáncreas.

El programa empleado consistió en un ciclo de desnaturalización previo de 10 minutos a 95°C, 45 ciclos de amplificación de 10 segundos a 95°C, 10 segundos a 60°C y 10 segundos a 72°C. Además se utilizó la opción que ofrece el *LightCycler 480 Software 1.5.0* (Roche Applied Science) para calcular las curvas de *melting* con el objetivo de ver la especificidad de la reacción, comprobando que el producto amplificado era el deseado. Este programa también se empleó para calcular el número de ciclos necesarios para alcanzar el *threshold cycle number* (Ct), es decir, ciclo a partir del cual la fluorescencia (y por tanto la cantidad de cDNA) aumenta de forma exponencial.

Los valores de Ct de las muestras se analizaron con el *software qBasePlus* (<http://www.biogazelle.com/products>) usando el gen *Elongation Factor-2* (EF-2), un gen constitutivo, como gen de referencia en ambos tejidos para hacer el análisis de expresiones relativas.

Se compararon las muestras tratadas con las control usando el método de cuantificación relativa con respecto a las muestras control y se representaron los valores en una escala logarítmica en gráficos de barras.

RESULTADOS

1. Selección de secuencias y diseño de *primers*

Dentro del proyecto en el que se engloba el presente trabajo se realizaron 4 genotecas de sustracción, 2 de branquia y 2 de hepatopáncreas. Una genoteca de branquia de individuos alimentados con 200 cél/mL de OA durante 1 día (*forward*, cuyo contenido de OA no es conocido ya que en este tejido no se detecta hasta los 3-4 días de exposición) y otra de individuos control alimentados con algas no tóxicas (*reverse*, que presentaron una concentración de OA de 0 ng/g). Una genoteca de hepatopáncreas de individuos alimentados con 200 cél/mL de OA durante 1 día (*forward*, que presentaron una concentración de 489 ng/g de OA) y otra de individuos control alimentados con algas no tóxicas (*reverse*, una vez más con una concentración de 0 ng/g).

Los productos obtenidos en estas genotecas de sustracción se purificaron y clonaron en vectores T&A. La secuenciación se realizó en el servicio de secuenciación Secugen (Biological Research, Madrid) y la secuencias generadas fueron ordenadas en *contigs* y *singletons*, separadamente en cada genoteca mediante el programa *EGassembly*. Estas secuencias fueron analizadas mediante el *software* Blast2GO para comprobar su similitud con secuencias de las bases de datos (NCBI, EMBL) y se agruparon en categorías funcionales.

En este trabajo, nos centramos en un total de 7 EST (Tablas 1 y 2) obtenidos en estas genotecas. Se seleccionaron aquellos que aparecían sobrerrepresentados en alguna de las genotecas o que presentaron homología con genes implicados en procesos biológicos importantes, fundamentalmente relacionados con esterasas que, ya que son enzimas que intervienen en numerosos procesos biológicos de hidrólisis en diferentes tejidos, se cree que el hecho de que aparezcan diferencialmente expresadas en las genotecas puede indicar un posible papel de las mismas en la respuesta del mejillón al OA. El gen de referencia empleado para el posterior análisis comparativo fue el gen constitutivo *elongation factor 2 (EF-2)*, obtenido a partir de la bibliografía (Craft *et al.*, 2010) y ampliamente utilizado en nuestro laboratorio. En las Tablas 1 y 2 se muestran los genes seleccionados para cada tejido, la genoteca de la que procedieron, los *primers* utilizados y la razón por la que fueron elegidos.

Tabla 1: Genes procedentes de las genotecas de sustracción de branquia seleccionados para su evaluación por PCR en tiempo real.

| BRANQUIA | | | | |
|--|----------------------|-------------------------|----------------|--------------------|
| Gen | Primer FORWARD | Primer REVERSE | Genoteca | Razón |
| <i>Isoform cra_c</i> | TGGGGAGATAAATCCTGTGG | GCATTCCCTCATTTTGGTTG | <i>Forward</i> | Sobrerrepresentado |
| <i>rapunzel 5</i> | TGGGGAGATAAATCCTGTGG | GGCGCGATTGGTTAGTCATA | <i>Forward</i> | Sobrerrepresentado |
| <i>pancreatic triacylglycerol lipase</i> | GAGCGCTCATAGCCAAACTC | GAGCGCTCATAGCCAAACTC | <i>Reverse</i> | Esterasa |
| <i>EF-2</i> | ACCACGACGCTTGTTGAGA | TTCTTGGTAGAAATTCAGTGCCA | - | Gen constitutivo |

Tabla 2: Genes procedentes de la genotecas de sustracción de hepatopáncreas seleccionados para su evaluación por PCR en tiempo real.

| HEPATOPÁNCREAS | | | | |
|--|-----------------------|-------------------------|----------|---|
| Gen | Primer FORWARD | Primer REVERSE | Genoteca | Razón |
| <i>long chain acyl-dehydrogenase</i> | TGATAACATGATGGCCGTTG | CCTGGAAAAATCTTCGGACA | Reverse | Esterasa |
| <i>sialic acid acetyltransferase</i> | TGTTGCTAATTCTCCACCAG | TGTAGCCAGAGCTGTCTATGG | Reverse | Esterasa |
| <i>v-myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i> | GGCTCCCCTACTAGCATCGT | AAGCCAACAATGGAGTGAC | Forward | Relacionado con factores de transcripción |
| <i>n-(beta-n-acetylglucosaminy)-asparaginase</i> | CATCACCAAATAAGACGTCAC | CAATAACAGCAATGTCCTCATCT | Reverse | Esterasa |
| <i>EF-2</i> | ACCACGACGCTTGTTGAGA | TTCTTGGTAGAAATTCAGTGCCA | - | Gen constitutivo |

2. Evaluación de la eficacia de *primers* mediante PCR

Tras diseñar los *primers* con las herramientas *Universal Probe Library* y *Primer 3*, se realizó una prueba de los mismos mediante una PCR convencional comprobando, con una posterior electroforesis (Figuras 8 y 9) que el fragmento resultante de la amplificación se correspondía con el tamaño esperado para cada gen y observando si existía amplificación de productos no específicos o contaminación. En todos los casos se obtuvo únicamente el producto esperado, excepto en el caso del gen *n-(beta-n-acetylglucosaminy)-asparaginase* cuyos *primers* amplificaban productos no específicos (Figura 9, carriles 5-7), por lo que éste no se incluyó en el estudio posterior.

Branquia

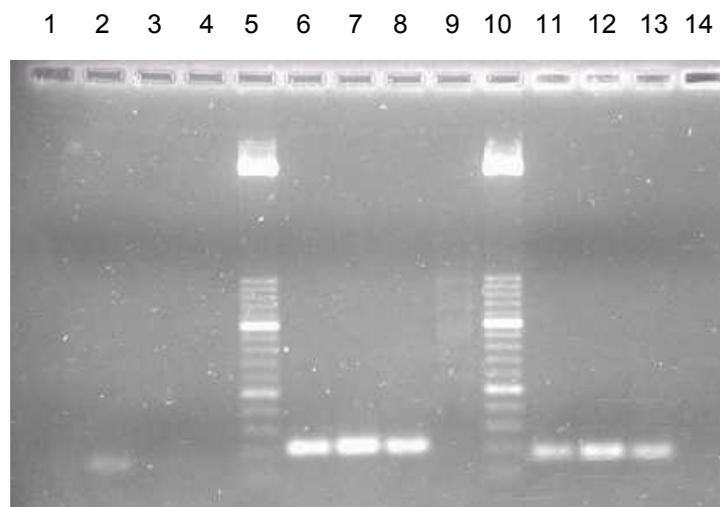


Figura 8: PCR para prueba de *primers* de genes de branquia. Carriles 1-3: *rapunzel 5*, carriles 6-8: *isoform cra_c*, carriles 11-13: *pancreatic triacyl-glycerol lipase*. Carriles 4,9,14: blancos. Carriles 5 y 10: *Marker XIII*.

Hepatopáncreas

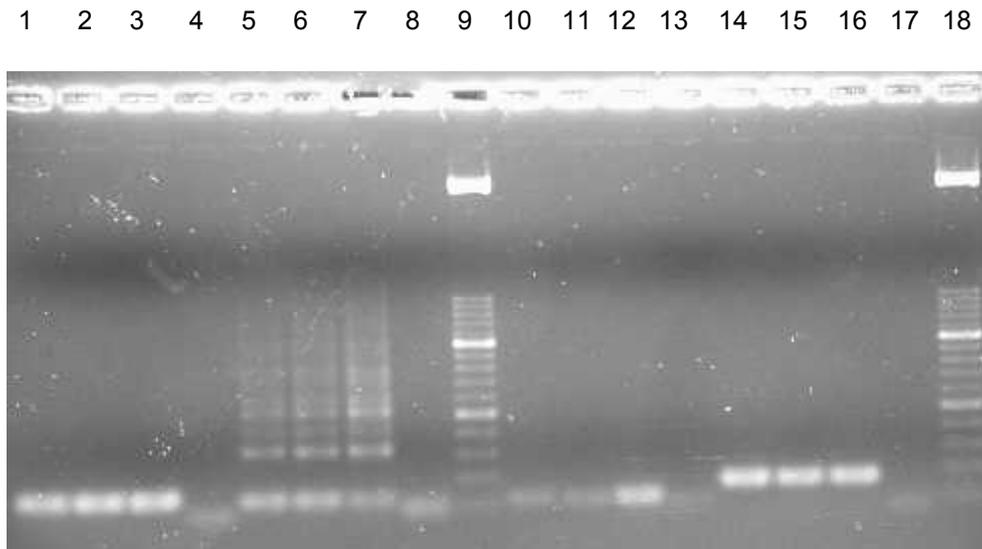


Figura 9: PCR para prueba de *primers* de genes de hepatopáncreas. Carriles 1-3: *Myc homolog*, carriles 5-7: *n-(beta-n-acetylglucosaminyl)-asparaginase*, carriles 10-12: *sialic acid acetyesterase*, carriles 14-16: *long chain acyl-dehydrogenase*. Carriles 4,8,13,17: blancos. Carriles 9,18: *Marker XIII*.

3. Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real

Para ambos tejidos, el estudio de estos genes mediante PCR en tiempo real en individuos tratados con *P.lima* permitió observar genes que presentaban distintos patrones de sobreexpresión o represión. Los datos obtenidos se analizaron con el *software qBasePlus*, cuyo resultado (Tablas anexas 1 y 2) aparece representado en la Figuras 10 y 11, en donde las sobreexpresiones o represiones significativas han sido marcadas con un asterisco.

Branquia

El gen *rapunzel 5 (rpz 5)*, elegido por encontrarse sobrerrepresentado en las genotecas, muestra un patrón de sobreexpresión significativo en los individuos alimentados con 200 cél/mL de *P.lima* y un patrón de represión significativo en los individuos alimentados con 20000 cél/mL.

El gen *pancreatic triacyl-glycerol lipase (PNLIP)*, relacionado con las enzimas estererasas, muestra un patrón de sobreexpresión en este caso no significativo a ambas concentraciones.

Por último, el gen *isoform cra_c (CCNC)*, seleccionado por encontrarse sobrerrepresentado, muestra un patrón de represión no significativo a ambas concentraciones.

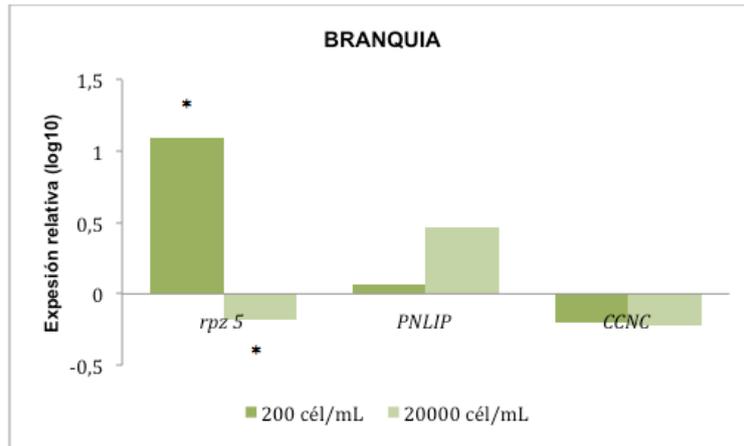


Figura 10: Expresión cuantitativa de los genes seleccionados de las genotecas *forward* y *reverse* en células de branquia de mejillones alimentados durante 1 día con 200 células/mL y 20000 células/mL de *P.lima*. *rpz 5*: *rapunzel 5*, *PNLIP*: *pancreatic triacyl-glycerol lipase*, *CCNC*: *isoform cra_c..*. *: Valor significativo.

Hepatopáncreas

El gen *sialic acid acetyltransferase (SIAE)*, elegido por presentar actividad esterasa, muestra un patrón de sobreexpresión significativo a ambas concentraciones.

El gen *long chain acyl-dehydrogenase (ACADAVL)*, seleccionado también por presentar actividad esterasa, muestra un patrón de represión no significativo a ambas concentraciones.

Por último, el gen *v-myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*, (*MYC*), relacionado con los factores de transcripción, presenta un patrón de sobreexpresión no significativo en individuos alimentados con 200 células/mL de *P.lima* y significativo en individuos tratados con 20000 células/mL.

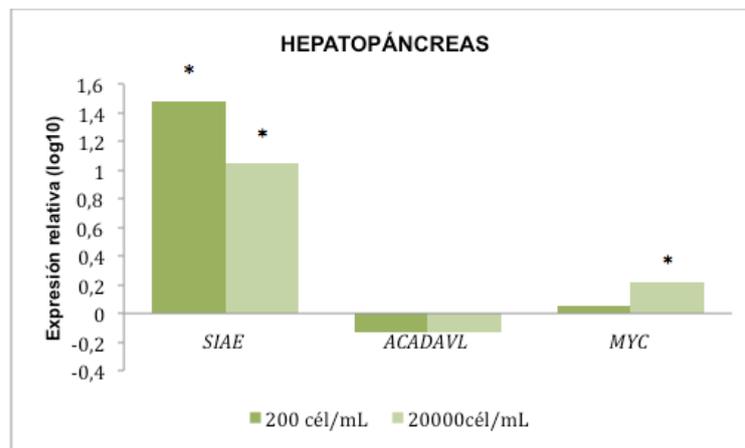


Figura 11: Expresión cuantitativa de los genes seleccionados de las genotecas *forward* y *reverse* en células de hepatopáncreas de mejillones alimentados durante 1 día con 200 células/mL y 20000 células/mL de *P.lima*. *SIAE*: *sialic acid acetyltransferase*, *ACADAVL*: *long chain acyl-dehydrogenase*, *MYC*: *myc homolog*. *: Valor significativo.

DISCUSIÓN

El poliéter marino OA es una ficotoxina producida por varios tipos de dinoflagelados, entre los que se incluye la especie *P.lima*, que tiene un importante impacto en la salud humana, economía y ciencia. La razón principal es que el OA se acumula en moluscos bivalvos como los mejillones, que filtran el fitoplancton y que son consumidos por el hombre, causando la intoxicación diarreica. La presencia de OA en moluscos bivalvos desencadena una expresión diferencial de varios genes implicados en distintos procesos biológicos. Así, el estudio de esta expresión nos proporciona una buena herramienta para comprender estos procesos y elegir genes que puedan ser utilizados como bioindicadores de contaminación para emprender medidas de prevención y mejorar los programas de monitorización actuales. Además, esta información podría tener una repercusión a nivel productivo, por ejemplo, el conocimiento de aquellos genes que pueden participar o influir en los procesos de depuración de esta biotoxina.

El genoma del mejillón no ha sido secuenciado hasta la fecha por lo que el estudio de estos procesos se encuentra ligado a su transcriptoma y se lleva a cabo haciendo comparaciones con otras especies genéticamente más estudiadas, señalando la necesidad de que esta secuenciación se lleve a cabo en un futuro próximo. Las herramientas más utilizadas con este fin son las genotecas de sustracción y la PCR cuantitativa a tiempo real que en conjunto proporcionan datos sobre los niveles de expresión génica en diferentes condiciones. Los datos obtenidos en estudios anteriores en nuestro laboratorio mediante estas técnicas en células de *M.galloprovincialis* muestran efectivamente genes sobreexpresados ante el OA relacionados con el sistema inmune (*ferritin*, *myticin B*), maquinaria de traducción (*EF-1*), genes de estrés oxidativo (*manganase superoxide dismutase*), de detoxificación y relacionados con el citoesqueleto (*actin-5C*). Los genes reprimidos están relacionados con el ciclo celular (*anaphase promoting complex*), citoesqueleto (*fascin*, *gelsolin*, *dynein*), inducción de daño oxidativo (*peroxirredoxin*) y defensa (*vitelin coat lysin*) (Flórez-Barrós, 2012).

Entre los tejidos más empleados en estos estudios de toxicidad en moluscos bivalvos, y que por tanto han sido también los elegidos en este trabajo, se encuentran la branquia y el hepatopáncreas (Venier *et al.*, 2006; Tanguy *et al.*, 2008; Flórez-Barrós, 2012; Varotto *et al.*, 2013). Ambos tienen en común su papel principal en la interacción con el ambiente y es por eso que sus transcritos son relativamente similares (Craft *et al.*, 2010). Sin embargo, tienen funciones muy diferentes ante la entrada de toxinas en el mejillón. La branquia es la primera barrera que toma contacto con la toxina presente en las microalgas que el mejillón ingiere y cuyos cilios arrastran al surco bucal. El hepatopáncreas, un órgano de enorme importancia en los procesos de digestión, es el encargado de la detoxificación de compuestos y en él sí se produce la acumulación de la toxina. Estas diferencias hacen que el patrón de expresión diferencial de genes en ambos tejidos sea distinto, como muestran los resultados obtenidos en este trabajo.

Los mecanismos de detoxificación del OA por parte del mejillón están todavía sujetos a discusión. Los modelos de entrada del OA en las células del hepatopáncreas parece señalar algún tipo de difusión facilitada con potasio u otros agregados de la toxina, una vez en el interior se ha visto que el OA se encuentra en dos formas, una más difícil de degradar que la otra. En un principio se pensaba que esto era debido a los dos tipos de células que este órgano presenta (digestivas y secretoras), sin embargo, lo que ocurre es una unión diferencial del OA a componentes celulares. Por tanto, el OA se encuentra en la fracción soluble de la célula, libre o unido a biomoléculas. Estas biomoléculas parecen ser lipoproteínas, como ocurre con el colesterol en humanos y que concuerda con que el OA se acumule en el hígado, principal almacén lipídico. Esta interacción podría tener el papel de hacer el OA menos reactivo, limitando sus lugares de unión a otros componentes celulares que pudiera dañar, lo que también se puede conseguir mediante otras modificaciones de la molécula, consiguiendo finalmente su excreción. Así el estudio de las heces del mejillón revela la existencia de OA principalmente en derivados ésteres acilados (DTX3) por lo que podría existir un mecanismo apolar, similar al descrito para esteroides en otros moluscos en el que la esterificación es la transformación principal en el mecanismo de depuración. La actividad acyltransferasa se ha encontrado efectivamente en células de la glándula digestiva del mejillón, concretamente asociada al retículo endoplasmático y al aparato de Golgi (Escudeiro-Rossignoli, 2013).

En este estudio se analizaron, mediante PCR en tiempo real, los efectos del OA sobre los niveles de expresión génica de 6 ESTs). Los ESTs fueron seleccionados por su sobrerrepresentación

en alguna genoteca o su relevancia en diversos procesos biológicos de importancia, como las esterasas. Estas enzimas catalizan reacciones de hidrólisis de compuestos esterificados y, ya que la adición de grupos acilo parece ser una de las transformaciones que el OA sufre en los procesos de detoxificación en el mejillón, puede ser que estas reacciones tengan alguna función en este proceso, actuando sobre el OA modificado. El análisis de los resultados se llevó a cabo posteriormente mediante el *software qBasePlus* utilizando como gen de referencia el gen *EF-2*, por ser un gen constitutivo englobado en la familia de los *elongation factor*, relacionados con la maquinaria de transcripción, que constituyen el segundo grupo de transcritos más abundantes asociados al metabolismo de proteínas en todos los tejidos del mejillón, llegando a conformar el 35-40% de los transcritos de branquia y hepatopáncreas (Craft *et al.*, 2010).

De los 3 genes estudiados en branquia el único que mostró cambios de expresión significativos fue *rpz 5* con una sobreexpresión clara ante la exposición del mejillón a *P.lima* a 200 cél/mL durante 1 día, y una represión de menor magnitud, pero también significativa, cuando la concentración aumentó a 20000 cél/mL (Figura 10). La búsqueda del gen *rpz* en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) resulta en la identificación del mismo en el pez zebra *Danio rerio*. Se encontró por ser el responsable de una mutación que causa un crecimiento excesivo del esqueleto axial y de las aletas en heterocigosis y que es letal en homocigosis. Codifica para la proteína *rpz* y forma parte de una familia de genes relacionados de la que se encuentran 5 genes parálogos (*rpz 1*, *rpz 2*, *rpz 3*, *rpz 4* y *rpz 5*) en este organismo y cuya secuencia se encuentra muy conservada en teleósteos (Green *et al.*, 2009). Este gen todavía no estaba caracterizado y, hasta la fecha, su función exacta se desconoce. Al no existir información muy extensa sobre el mismo, y en las condiciones de este trabajo, resulta difícil suponer cuál puede ser su función en el mejillón.

El patrón observado en *rpz 5*, aumento de expresión a concentraciones bajas de la toxina tras 1 día de tratamiento y la disminución de la misma a concentraciones más altas, concuerda con lo visto en nuestro laboratorio para otros genes, normalmente de hepatopáncreas. Esto señala la rapidez y eficacia características de la respuesta del mejillón a la intoxicación por OA, que hace que pueda eliminarlo muy rápidamente evitando que la toxina cause efectos dañinos en el molusco. Este organismo presenta un valor de concentración umbral muy bajo de OA a partir del que activa rápidamente los mecanismos de respuesta a esta toxina y que hace que a concentraciones mucho más altas de OA esta respuesta no se observe ya que el mejillón ya habrá activado y finalizado su respuesta ante el estrés que puede causar la toxina. Es por eso que el hecho de que la sobreexpresión se produzca a concentraciones bajas y con tiempos cortos de exposición sugiere que, con un estudio más exhaustivo, este gen podría ser un buen bioindicador de una respuesta temprana a contaminación ambiental. En este caso no cabe pensar que esté implicado en la detoxificación de la toxina ya que en la branquia no se dan estos procesos, pero sí que podría señalar algún tipo de metabolismo activado tempranamente ante el OA en branquia en el que este gen tiene una gran importancia, indicando su represión a concentraciones más altas que, tras la respuesta inicial, seguramente sean otros los genes y las rutas las que se activen, haciendo que las células necesiten menos la expresión de este gen que en condiciones normales.

El gen *PNLIP* es un miembro de la familia de genes de las lipasas. Codifica una carboxil esterasa que hidroliza triglicéridos emulsionados insolubles y es esencial para la digestión eficiente de las grasas de la dieta. Se ha descrito principalmente en mamíferos y su actividad suele encontrarse asociada al páncreas por lo que su sobreexpresión a ambas concentraciones en branquia, aunque no es estadísticamente significativa, resulta llamativa (Figura 10). La información correspondiente a la función y características de este gen así como el resto de los genes presentados a continuación cuyo análisis de expresión diferencial no ha resultado estadísticamente significativo ha sido extraída de la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

El gen *CCNC* codifica una proteína miembro de la familia de las ciclinas. La proteína codificada interactúa con la quinasa dependiente de ciclina 8 e induce la fosforilación del dominio carboxi terminal de la subunidad grande de la RNA polimerasa II. El nivel de mRNAs para este gen aumenta durante la fase G1 del ciclo celular. Se han encontrado dos isoformas para este gen. Su expresión se ha visto reprimida ante la presencia de OA, aunque este resultado no ha sido estadísticamente significativo en este caso (Figura 10).

En el caso del hepatopáncreas fueron dos los genes que mostraron una sobreexpresión significativa: a 200 cél/mL y a 20000 cél/mL en el caso de *SIAE*, y a 20000 cél/mL en el caso del gen *MYC* (Figura 11).

El gen *SIAE* codifica para una enzima implicada en el proceso de tolerancia inmunológica, disminuyendo la señalización del receptor de antígeno de las células B, producidas en el hígado. Actúa desacetilando el ácido siálico de ciertas moléculas de membrana de las células B determinando así el ligando que se podrá unir a ellas para desencadenar una respuesta inmunitaria y evitando que las moléculas o células propias del organismo lo hagan (Pillai *et al.*, 2009). Se ha descrito en numerosas ocasiones, en mamíferos principalmente, y su distribución coincide con la presencia de ácido siálico, que al principio no se conocía en bivalvos pero que sí se ha encontrado en tejidos como la hemolinfa, relacionado con procesos de reconocimiento entre células y moléculas en procesos inmunes (Tunkijjanukij *et al.*, 1998). La sobreexpresión de este gen está en consonancia con el efecto desregulador que el OA tiene sobre el sistema inmune y con la sobreexpresión de genes relacionados con el mismo ante la presencia de un compuesto extraño como esta toxina. Además, entre todos los genes estudiados relacionados con las esterases, éste es el único que parece tener una clara sobreexpresión ante la presencia de OA. Así, se podría estudiar su papel potencial en el procesamiento y modificaciones que el OA sufre en el hepatopáncreas de mejillón.

El gen *MYC* fue encontrado por primera vez en el genoma de pollo y es homólogo a genes transformantes (oncogenes) de retrovirus de aves. Forma parte de una familia de genes de los que varios, incluyendo *MYC*, tienen potencial neoplásico. En muchos de los cánceres estudiados en humanos se ha observado una sobreexpresión de este gen debido a mecanismos como translocaciones, que lo sitúan próximo a activadores. Posee un dominio de unión al DNA, funcionando como factor de transcripción y controlando la expresión de otros genes a la vez que interacciona con otros factores en una compleja red. Se encuentra implicado en la regulación y avance del ciclo celular, en la proliferación celular, metabolismo energético, biosíntesis de proteínas y la inducción de apoptosis (Lüscher y Vervoorts, 2012), todos ellos procesos afectados por OA. Además, el hecho de que esté muy relacionado con procesos cancerígenos y su expresión se vea aumentada ante el tratamiento de OA concuerda con la capacidad oncogénica atribuido al OA en humanos, aunque en el mejillón no haya constancia de estos procesos. Como ya se ha comentado, el OA es un inhibidor de fosfatasa, especialmente de la PP2A que a su vez actúa en mecanismos de supresión de tumores (Munday, 2013).

El gen *ACADAVL* codifica una proteína que actúa sobre la membrana mitocondrial interna donde cataliza el primer paso de la ruta de beta-oxidación de ácidos grasos de cadena larga o muy larga. Una deficiencia en este gen reduce la beta-oxidación miocárdica y se encuentra asociado con cardiomiopatía. En este caso su expresión se encuentra reprimida en los individuos tratados con OA pero no resulta significativa (Figura 11).

En este trabajo se ha analizado por primera vez la expresión diferencial de estos genes, sin embargo los resultados obtenidos deben ser corroborados posteriormente mediante el estudio de varias réplicas; así como en otros tejidos o bajo otras variables. Se podrían emplear otros programas para reforzar las conclusiones obtenidas como el programa REST (*Relative Expression Software Tool*) para realizar análisis estadísticos más certeros que los que incluye el propio programa *qBasePlus*. Además, quedan todavía muchos genes de *M.galloprovincialis* cuya expresión se encuentra sin estudiar y que podrían revelar nueva información. Así mismo, se podrían realizar estudios funcionales, procediendo a la caracterización completa de las proteínas que estos genes codifican (en qué se basa su capacidad, estructura, historia evolutiva, isoformas, expresión...) dilucidando los procesos en los que intervienen y llegando finalmente a su papel en la acción del mejillón ante el OA, que también puede proporcionar pistas sobre qué sucede cuando el OA entra en células humanas. Por último, debería también comprobarse que los genes objeto de este estudio son específicos de la contaminación por OA o, al contrario, de procesos de detoxificación en general.

CONCLUSIONES

En el mejillón *M. galloprovincialis*, la branquia y el hepatopáncreas presentan funciones diferentes ante la entrada de OA en el mejillón por lo que los patrones de expresión genética son diferentes en ambos tejidos.

En branquia:

1. El patrón de expresión del gen *rpz 5*, que aparece sobreexpresado en mejillones expuestos a concentraciones bajas de OA sugiere que, con estudio más exhaustivo, este gen podría ser útil como biomarcador de contaminación temprana en el medio.
2. Los genes *PNLIP* y *CCNC* no mostraron un patrón de sobreexpresión o represión significativo en este estudio.

En hepatopáncreas:

3. La expresión diferencial del gen *SIAE* concuerda con el efecto desregulador del OA sobre el sistema inmune anteriormente descrito. Así mismo, la sobreexpresión de este gen cuyo producto proteico presenta actividad esterasa sugiere que estas enzimas sí pueden tener un papel potencial en el procesamiento del OA por parte del mejillón.
4. El gen *MYC* se encuentra sobreexpresado y su producto proteico puede actuar como factor de transcripción en numerosos procesos celulares sobre los cuales se ha descrito un efecto del OA, señalando el extenso rango de acción de esta toxina en las células de mejillón. Además, este gen se ha encontrado ampliamente relacionado con procesos cancerígenos por lo que su sobreexpresión podría suponer un indicio más de la relación entre el OA y el desarrollo de tumores.
5. El gen *ACADAVL* muestra un patrón de represión no significativo en individuos tratados con OA.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Josefina Méndez Felpeto, por darme la oportunidad de desarrollar mi trabajo en el marco del proyecto "Evaluación citogenética y molecular de la respuesta temprana del mejillón *Mytilus galloprovincialis* al ácido ocaico (OA)", AGL-2012-30897, permitiéndome formar parte de su grupo de investigación y dándome su apoyo en todo momento. A las doctorandas del grupo XENOMAR Alexia Sexto Iglesias y M^a Verónica Prego Faraldo sin cuyos consejos este trabajo no habría llegado a buen término así como al Técnico Superior de laboratorio Jose B. García Gil por su paciencia y por haberme enseñado a desenvolverme en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- Comisión Europea (2004) Reglamento (CE) No 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 139/55.
- Comisión Europea (2013) Reglamento (UE) No 15/2013 de la Comisión del 10 de enero de 2013 por el que se modifica el Reglamento (CE) no 2074/2005 en lo relativo a los métodos de análisis reconocidos para la detección de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos vivos. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 6/3.
- Consejo Regulador de la Denominación de Origen del Mejillón en Galicia (2012) [Internet] Disponible en: <http://www.mexillondegalicia.org/denominacion_de_orixe_protexida/sector.php> [Accedido 29 de abril de 2013].
- Craft, J.A., Gilbert, J.A., Temperton, B., Dempsey, K.E., Ashelford, K., Tiwari, B., Hutchinson, T.H. y Chipman, J.K. (2010) Pyrosequencing of *Mytilus galloprovincialis* cDNAs: Tissue-specific expression patterns. *PLoS ONE*, 5: e8875.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. y Siebert, P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93: 6025-30.
- Eggen, R., Behra, R., Burkhardt-Holm, P., Escher, B. y Schweigert, N. (2004) Challenges in ecotoxicology. *Environmental Science & Technology*, 38: 58-64.
- Escudeiro-Rossignoli, A. (2013) *Acumulación de toxinas DSP en el mejillón Mytilus galloprovincialis*. Tesis doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.
- Farrington, J.W., Davis, A.C., Tripp, B.W., Phelps, D.K. y Galloway, W.B. (1987) Mussel Watch-Measurements of chemical pollutants in bivalves as an indicator of coastal environmental quality. Boyle, T.P. (Ed.) *New approaches to monitoring aquatic ecosystems*. Baltimore: ASTM, Pp: 125-139.
- Fernández, J.J., Candenás, M.L., Souto, M.L., Trujillo, M.M. y Norte, M. (2002) Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Current Medicinal Chemistry*, 9: 229-262.
- Fernández-Tajes, J., Laffon, B. y Méndez, J. (2010) The use of biomarkers in bivalve molluscs for the evaluation of marine environment pollution. Ahmed el Nemr (Ed.). *Impact, Monitoring and Management of Environmental Pollution*. New York: Nova Science Publishers, Pp:409-429.
- Flórez-Barrós, F. (2012) *Desarrollo de biomarcadores citogenéticos y moleculares para su evaluación en moluscos bivalvos*. Tesis doctoral. Universidade da Coruña.
- Gerssen, A., Pol-Hofstad, I.E., Poelman, M., Mulder, P.P.J., van den Top, H.J. y de Boer, J. (2010) Marine Toxins: Chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation. *Toxins*, 2: 878-904.
- Green, J., Taylor, J.J., Hinder, A., Johnson, S.L. y Goldsmith, M.I. (2009) A gain of function causing skeletal overgrowth in the *rapunzel* mutant. *Developmental Biology*, 334: 224-234.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. y Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11: 1026-30.
- Livingstone, D.R. (1993) Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 57: 195-211.

- López-Rodas, V., Maneiro, E., Martínez, J. y Costa, E. (2006) Harmful algal blooms, red tides and human health: Diarrhetic shellfish poisoning and colorectal cancer. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 72: 391-408.
- Lüscher, B. y Vervoorts, J. (2012) Regulation of gene transcription by the oncoprotein MYC. *Gene*, 494: 145-160.
- Munday, R. (2013) Is protein phosphatase inhibition responsible for the toxic effects of okadaic acid in animals? *Toxins*, 5: 267-285.
- Pettersson, L.H. y Pozdnyakov, D. (2013) *Monitoring of harmful algal blooms*. Chichester: Springer.
- Pillai, S., Cariappa, A. y Pirnie, S.P. (2009) Esterases and autoimmunity: the sialic acid acetyltransferase pathway and the regulation of peripheral B cell tolerance. *Trends in Immunology*, 30: 488-493.
- Reece, R.J. (2004) *Analysis of genes and genomes*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Roche Applied Science (2008) *LightCycler 480 Instrument Operator's Manual: Software Version 1.5*. Penzberg: Roche Diagnostics GmbH.
- Suárez-Ulloa, V., Fernández-Tajes, J., Aguiar-Pulido, V., Rivera-Casas, C., González-Romero, R., Ausio J., Méndez, J., Dorado, J. y 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: 830-841.
- Tanguy, A., Bierne, N., Saavedra, C., Pina, B.J., Bachère, E., Kube, M., Bazin, E., Bonhomme, F., Boudry, P., Boulo, V., Boutet, I., Cancela, L., Dossat, C., Favrel, P., Huvet, A., Jarque, S., Jollivet, D., Klages, S., Lapèque, S., Leite, R., Moal, J., Moraga, D., Reinhardt, R., Samain, J., Zouros, E. y Canario, A. (2008) Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: Development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. *Gene*, 408: 27-36.
- Tunkijjanukij, S., Giaever, H., Chin, C.C.Q. y Olafsen, J.A. (1998) Sialic acid in hemolymph and affinity purified lectins from two marine bivalves. *Comparative Biochemistry and Physiology- B Biochemistry and Molecular Biology*, 119: 705-713.
- Varotto, L., Domeneghetti, S., Rosani, U., Manfrin, C., Cajaraville, M.P., Raccanelli, S., Pallavicini, A. y Venier, P. (2013) DNA damage and transcriptional changes in the gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed to nanomolar doses of combined metal salts (Cd, Cu, Hg). *PLoS ONE*, 8: e54602.
- Venier, P., Pallavicini, A., De Nardi, B. y Lanfranchi, G. (2003) Towards a catalogue of genes transcribed in multiple tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Gene*, 314: 29-40.
- Venier, P., de Pittà, C., Pallavicini, A., Marsano, F., Varotto, L., Romualdi, C., Dondero, F., Viarengo, A. y Lanfranchi, G. (2006) Development of mussel mRNA profiling: Can gene expression trends reveal coastal water pollution? *Mutation Research*, 602: 121-134.
- Woods Hole Oceanographic Institution (WHOI) (2007) *Harmful Algae* [Internet] Disponible en: < <http://www.whoi.edu/redtide/photos> > [Accedido 29 de abril de 2013].

ANEXO

BRANQUIA

Tabla anexa 1: Tabla del análisis ANOVA del *software qBasePlus* para tejido branquial.

| target | p | r2 | significant | value | mean | 95% value ci low | 95% value ci high | datapoints |
|--------------|------|------|-------------|---------|-------|---------------------|----------------------|------------|
| <i>rpz5</i> | 0,01 | 0,89 | | | | | | |
| | | | Yes | 200 | 12,37 | 3,92 | 39,02 | 4,00 |
| | | | Yes | 20000 | 0,65 | 0,12 | 3,64 | 2,00 |
| | | | No | Control | 1,00 | 0,01 | 83,57 | 2,00 |
| <i>PNLIP</i> | 0,40 | 0,31 | | | | | | |
| | | | No | 200 | 1,15 | 0,33 | 4,01 | 4,00 |
| | | | No | 20000 | 2,93 | 0,57 | 14,99 | 4,00 |
| | | | No | Control | 1,00 | 0,06 | 17,12 | 2,00 |
| <i>CCNC</i> | 0,53 | 0,17 | | | | | | |
| | | | No | 200 | 0,62 | 0,23 | 1,66 | 4,00 |
| | | | No | 20000 | 0,60 | 0,27 | 1,35 | 4,00 |
| | | | No | Control | 1,00 | 0,16 | 6,08 | 2,00 |

HEPATOPÁNCREAS

Tabla anexa 2: Tabla del análisis ANOVA del *software qBasePlus* para tejido de hepatopáncreas.

| target | p | r2 | significant | value | mean | 95% value ci low | 95% value ci high | Data- points |
|--------------------|----------------|----------------|-------------|---------|------------|---------------------|----------------------|-----------------|
| <i>SIAE</i> | 1,699 E-003 | 9,858 E-001 | | | | | | |
| | | | Yes | 200 | 3,043E+001 | 1,408E+001 | 6,577E+001 | 2,000E+ 00 |
| | | | Yes | 20000 | 1,127E+001 | 8,657E+000 | 1,468E+001 | 2,000E+ 00 |
| | | | No | Control | 1,000E+000 | 2,266E-002 | 4,413E+001 | 2,000E+ 00 |
| <i>ACAD VL</i> | 5,263 E-001 | 3,481 E-001 | | | | | | |
| | | | No | 200 | 7,448E-001 | 5,921E-002 | 9,370E+000 | 2,000E+ 00 |
| | | | No | 20000 | 7,359E-001 | 3,637E-001 | 1,489E+000 | 2,000E+ 00 |
| | | | No | Control | 1,000E+000 | 1,049E-002 | 9,537E+001 | 2,000E+ 00 |
| <i>MYC</i> | 5,793 E-001 | 3,051 E-001 | | | | | | |
| | | | No | 200 | 1,121E+000 | 1,097E+000 | 1,146E+000 | 2,000E+ 00 |
| | | | Yes | 20000 | 1,662E+000 | 9,795E-001 | 2,818E+000 | 2,000E+ 00 |
| | | | No | Control | 1,000E+000 | 2,851E-001 | 3,508E+000 | 2,000E+ 00 |