

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

**IDENTIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE GENES EXPRESADOS
DIFERENCIALMENTE EN EL MEJILLÓN
Mytilus galloprovincialis,
A PARTIR DE GENOTECAS NORMALIZADAS
PROCEDENTES DE INDIVIDUOS CONTROL Y TRATADOS
CON LA BIOTOXINA ÁCIDO OCADAICO**

Trabajo de Fin de Grado presentado por

ANDRÉS TABERNILLA GARCÍA

Junio 2014

Dirigido por Dra. Josefina Méndez Felpeto

RESUMEN

Las floraciones algales nocivas (FANs) constituyen uno de las principales fuentes de contaminación de los océanos, produciendo altas concentraciones de biotoxinas que son acumuladas a lo largo de las cadenas tróficas. Una de éstas, el ácido okadaico (OA), es producida por dinoflagelados marinos y posteriormente acumulada en los tejidos de los organismos marinos, extendiéndose en la cadena trófica y eventualmente llegando a los consumidores humanos, donde causa el síndrome diarreico (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*, DSP). En este trabajo se estudia la expresión diferencial de los genes *ferritin*, *myticin c*, *hemolactin* y las regiones génicas *unigen1* y *unigen2* en branquia y hepatopáncreas del mejillón *Mytilus galloprovincialis* como respuesta a la baja exposición del OA (200 células/mL de *Prorocentrum lima* durante un día) por medio de la aplicación de la técnica de PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos muestran como los genes y regiones génicas seleccionadas tienen un patrón de expresión diferente en los dos tejidos. Las regiones génicas *unigen1* y *unigen2* y el gen *hemolactin* debido a su sobreexpresión significativa podrían considerarse como posibles biomarcadores de contaminación temprana por OA en branquia. Por lo que respecta al gen *myticin c*, podría ser considerado como biomarcador en hepatopáncreas.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
<i>Blooms</i> algales nocivos y toxinas asociadas.....	1
El síndrome DSP: distribución, organismos productores y toxinas DSP	2
El ácido okadico (OA): mecanismo de acción y detección.....	4
Los biomarcadores en la biomonitorización ambiental.....	4
Genómica y transcriptómica del mejillón.....	6
OBJETIVO	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Material objeto de estudio	8
Extracción de RNA, purificación, cuantificación y control de calidad.....	8
Síntesis de cDNA.....	9
Selección de genes para PCR en tiempo real, diseño y obtención de <i>primers</i>	9
Evaluación de la eficacia de <i>primers</i> mediante PCR.....	10
Electroforesis de los productos de amplificación	10
Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real.....	10
RESULTADOS	14
Selección de secuencias y diseño de <i>primers</i>	14
Evaluación de la eficacia de los <i>primers</i>	14
Análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real.....	15
DISCUSIÓN	18
CONCLUSIONES	21
REFERENCIAS	22

INTRODUCCIÓN

1. *Blooms* algales nocivos y toxinas asociadas

Las floraciones algales nocivas (FANs) o *blooms* de microalgas marinas son un fenómeno natural de proliferación fitoplanctónica que aparece en las costas de todo el mundo, constituyendo uno de los episodios más importantes de contaminación natural del medio marino. Algunas de las especies implicadas en estas floraciones, sobre todo ciertas clases de dinoflagelados y diatomeas, tienen la capacidad de producir toxinas marinas o ficotoxinas (Gerssen *et al.*, 2010; Pettersson & Pozdnyakov, 2013).

Comúnmente, estos afloramientos se denominan “mareas rojas”, debido a la capacidad de algunas microalgas para cambiar la coloración de la superficie del agua a rojo, verde, pardo o amarillo (dependiendo de las especies implicadas). No obstante, esta denominación es inexacta pues, algunas proliferaciones que colorean el agua no son nocivas y, por otro lado, algunas proliferaciones que no la colorean sí lo son. Por estas razones, el término FANs resulta más adecuado para referirnos a estos episodios (Anderson & Garrison, 1993; Pettersson & Pozdnyakov, 2013).

La producción de ficotoxinas parece actuar como un mecanismo de competencia espacial, al evitar que se produzca la proliferación de otras especies fitoplanctónicas (Gerssen *et al.*, 2010). Una vez producidas, estas ficotoxinas, pueden ser almacenadas por varios tipos de especies marinas, entre las que destacan diversos moluscos bivalvos como mejillones, ostras, almejas o vieiras, en los que son acumuladas en las glándulas digestivas, sin provocar daños aparentes en el individuo. Así mismo, estos organismos pueden actuar como vectores de las ficotoxinas, haciendo que éstas se transfieran a niveles superiores de la cadena trófica, llegando incluso a causar daños en consumidores humanos (Gerssen *et al.*, 2010; Valdiglesias *et al.*, 2013) tal y como muestra la Figura 1. Los mencionados efectos negativos de las ficotoxinas en la salud, así como los daños que causan sobre los ecosistemas y organismos marinos, junto con las cuantiosas pérdidas económicas en las industrias de acuicultura, recreo o turismo (Gerssen *et al.*, 2010; Pettersson & Pozdnyakov, 2013) han motivado el desarrollo de metodologías de detección de estas ficotoxinas y la investigación de sus efectos en diversos grupos de organismos (Prego-Faraldo *et al.*, 2013; Valdiglesias *et al.*, 2013), con el fin de minimizar sus consecuencias negativas y detectar, de manera temprana, el inicio del *bloom*.

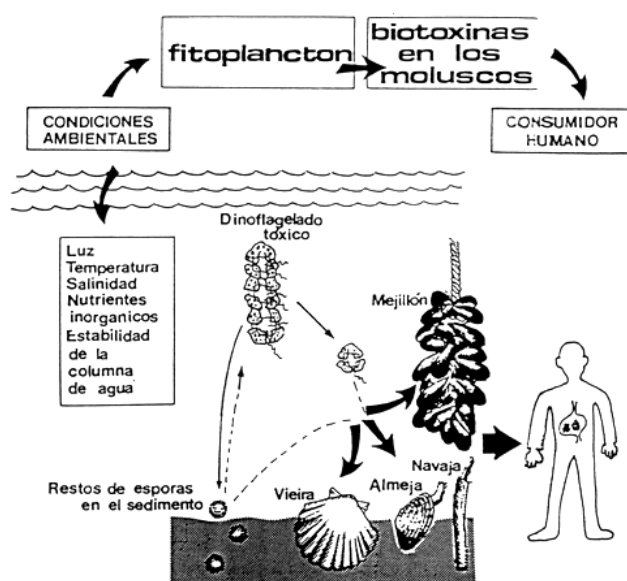


Figura 1: Transferencia de las biotoxinas marinas a través de la cadena trófica (Fuente: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab710e/ab710e24.htm>).

Las ficotoxinas se pueden clasificar de varias maneras, una de ellas las divide en seis grupos distintos, atendiendo a su estructura química y a los síntomas observados en intoxicaciones humanas: paralizantes (*Paralytic Shellfish Poisoning*, PSP), diarreicas (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*, DSP), neurotóxicas (*Neurotoxic Shellfish Poisoning*, NPS), amnésicas (*Amnesic Shellfish Poisoning*, ASP), azaspirácidos (*Azaspiracid Poisoning*, AZP) y causantes de ciguatera (*Ciguatera Fish Poisoning*, CFP) (Daranas *et al.*, 2001; Gerssen *et al.*, 2010). En el presente trabajo nos centraremos en las toxinas DSP debido a que son las principales responsables de los incidentes tóxicos en Galicia.

2.- El síndrome DSP: distribución, organismos productores y toxinas DSP

El síndrome de intoxicación diarreica por marisco (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*, DSP) fue descrito por primera vez en el año 1976 por Yasumoto y colaboradores, motivados por una serie de episodios gastrointestinales derivados del consumo de mejillón (*Mytilus edulis*) y de vieira (*Patinopecten yessoensis*) en el Noroeste de Japón. Este síndrome se caracteriza por severos síntomas gastrointestinales, entre los que se incluyen diarrea (92%), náuseas (80%), vómitos (79%), dolor abdominal (53%) y escalofríos (10%). La intensidad de estos síntomas depende de la cantidad de toxina ingerida, siendo 40 µg la dosis mínima necesaria en adulto para la aparición de la sintomatología descrita. Los síntomas suelen aparecer entre los 30 minutos y las 4 horas posteriores a la ingesta y suelen mantenerse durante tres días, no requiriendo una hospitalización (Valdiglesias *et al.*, 2013).

Tal y como se puede observar en el mapa de la Figura 2, los episodios de DSP están ampliamente distribuidos a lo largo de del mundo, siendo especialmente importantes en Europa, Japón y Sudamérica, a pesar de que nuevos episodios están apareciendo continuamente en nuevas zonas (Canadá, México, India, Tailandia, China y Australia). Una de las zonas de mayor incidencia de DSP del mundo y con un mayor tiempo de prohibición de la recolección de moluscos bivalvos tras un episodio tóxico, es la costa oeste europea (Reguera *et al.*, 2014). Dentro de ésta, España se encuentra bastante afectada, especialmente la zona noroeste, en la que estos fenómenos son frecuentes a lo largo de todo el año y donde se encuentran los mayores productores de moluscos bivalvos. Galicia es la principal comunidad autónoma productora de mejillón a nivel español, con un 95% de la producción total del país (200.000 toneladas) y más de 3500 bateas (Martínez-Escariariza, 2013), lo que supone un volumen de facturación anual de 500 millones de euros. Estas cifras sitúan a España como el segundo productor mundial de mejillón después de China y al cultivo de mejillón, como una de las principales fuentes de ingresos de la comunidad autónoma gallega (Consejo Regulador de la Denominación de Origen del Mejillón de Galicia, 2012).



Figura 2: Distribución global de la localización de los puntos donde las toxinas DSP han sido detectadas. Tomado de: Reguera *et al.*, 2014.

Los principales organismos asociados a eventos de DSP son dinoflagelados pertenecientes a los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum*, descritos por primera vez por Yasumoto y colaboradores en el año 1985 (Figura 3). El género *Dinophysis* está compuesto aproximadamente por 120 especies planctónicas, de las cuales, sólo 10, han sido identificadas como productoras de toxinas. A su vez, el género *Prorocentrum*, compuesto por especies bentónicas como *P. lima* y *P. masculosum* parece contribuir a la acumulación de toxinas DSP en áreas de cultivo de bivalvos con elevada turbulencia, en las que estas microalgas bentónicas pueden ser fácilmente resuspendidas en la columna de agua y pasar a estar disponibles para los organismos filtradores (Reguera *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de esta gran variedad de organismos relacionados con la producción de toxinas DSP, a nivel global, parece que tan solo seis especies del género *Dinophysis* (*D. acuminata*, *D. fortii*, *D. acuta*, *D. novergica*, *D. mitra* y *D. Rotundata*) son las responsables de la mayor parte de los episodios DSP (Reguera *et al.*, 2014). En el caso de Galicia, las especies responsables de los abundantes episodios tóxicos de DSP varían de unas rías a otras, aunque están asociados especialmente a las especies del género *Dinophysis* (*D. acuminata* y *D. acuta*) (Blanco *et al.*, 2005).



Figura 3: Organismos causantes del síndrome DSP (de izquierda a derecha): *Dinophysis acuta*, *Dinophysis acuminata* y *Prorocentrum lima*. Barra de escala = 20 μ m. Tomado de: Riobó *et al.*, 2013.

Las toxinas DSP son compuestos poliéter estables lipofílicos derivados del metabolismo secundario. Esta naturaleza lipofílica, hace que las toxinas DSP se acumulen en tejidos adiposos como el hepatopáncreas de los moluscos bivalvos. Su estructura básica está compuesta por una cadena de 38 carbonos en la que, la posición y número de sus grupos metilo, así como la presencia de ácidos grasos saturados e insaturados en el esqueleto carbonado, dan lugar a diversos derivados (Domínguez *et al.*, 2010). De entre todas las toxinas DSP, el ácido okadaico (OA) es el principal representante de las toxinas DSP y el principal responsable de la contaminación de los mejillones de las costas gallegas (Figura 4). Además de este compuesto, otras biotoxinas causantes de DSP son el grupo de las dinofisistoxinas o DTXs: análogos del OA como la dinofisistoxina-1 (DTX1) y la dinofisistoxina-2 (DTX2), sus diol éster precursores (grupos DTX4 y DTX5) y sus acil derivados (grupo DTX3) (Domínguez *et al.*, 2010; Prego-Faraldo *et al.*, 2013; Valdiglesias *et al.*, 2013).

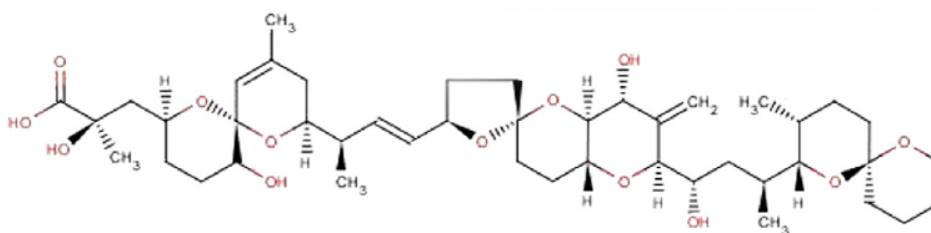


Figura 4: Estructura química del ácido okadaico (OA). Tomado de Valdiglesias *et al.*, 2013.

3.- El ácido okadaico (OA): mecanismo de acción y detección

El ácido okadaico fue aislado e identificado por primera vez por Tachibana y colaboradores en 1981, concretamente en esponjas marinas del género *Halichondria* (Tachibana *et al.*, 1981) y, posteriormente, Murakami y colaboradores descubrirían este compuesto en el dinoflagelado *Prorocentrum lima* (Murakami *et al.*, 1982).

El modo de acción del OA consiste en inhibir ciertas proteínas fosfatasa (PP) serina/treonina, principalmente la PP de tipo 1 (PP1) y la de tipo 2A (PP2A), que juegan papeles importantes en la regulación de procesos celulares esenciales, entre los que se incluye el crecimiento, la división, la muerte y el mantenimiento de la estructura del citoesqueleto. Debido a su importante papel en múltiples procesos celulares, el OA podría ser empleado como una prometedora herramienta farmacológica en el estudio de la señalización celular (Valdiglesias *et al.*, 2013).

Debido a su amplio mecanismo de acción, se ha sugerido que esta toxina puede ser mucho más que un simple agente diarreico, causando efectos citotóxicos como la inducción de apoptosis, alteraciones del ciclo celular, estrés oxidativo; neurotóxicos, como la apoptosis neuronal o alteraciones de la morfología y del citoesqueleto de las neuronas; inmunotóxicos; embriotóxicos; genotóxicos con lesiones del DNA como la formación de micronúcleos, daño oxidativo del ADN, intercambios de cromátidas hermanas, roturas de hebras de DNA o la inducción de tumores y cáncer, debido a la modificación del estado de fosforilación de ciertas proteínas celulares (Valdiglesias *et al.*, 2013). Sin embargo, algunos de los efectos no parecen ser explicados por esta alteración, con lo que se ha sugerido que deben existir otras posibles dianas celulares y moleculares del OA, capaces de explicar dichos efectos, lo que ha hecho que las investigaciones en este campo hayan ido aumentando paulatinamente (Munday, 2013).

La legislación de la Unión Europea establece que no se 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 (EC Commision Regulation 2074/2005/EC).

Asimismo, la UE también establece el método oficial de detección de OA en tejidos de moluscos: los bioensayos de ratón (MBA) o rata (RBA) (EC Commision Regulation 2074/2005/EC). Estos bioensayos consisten en la inyección de un extracto equivalente a 5g de bivalvo a un grupo de ratones o de ratas a estudiar. La muerte de dos o tres individuos en un período de 24 horas después de la inoculación del extracto será un resultado positivo, indicando que los niveles de toxina sobrepasan los límites impuestos por la Unión Europa (EC Commision Regulation 2074/2005/EC). A pesar de que este bioensayo es el método oficial para detectar OA, tiene una gran cantidad de desventajas como su baja especificidad y sensibilidad, el uso de animales de laboratorio con sus problemas éticos y técnicos derivados, su elevado coste o la necesidad de un largo periodo de tiempo para obtener los resultados. Todas estas limitaciones han hecho que se desarrollen métodos alternativos que mejoren o reemplacen estos dos bioensayos (Prego-Faraldo *et al.*, 2013; Reguera *et al.*, 2014). Así, en el año 2011 se modifica el reglamento, permitiendo emplear como método alternativo la cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (EC Commision Regulation 15/2011/EC).

Además de métodos de detección *in vivo*, como los anteriores, existen otras alternativas como ensayos *in vitro*, métodos bioquímicos y métodos químicos, pero todas ellas presentan diversos inconvenientes, de modo que deben seguir mejorándose con el fin de ser más simples, rápidos, reproducibles, sensibles y económicos (Prego-Faraldo *et al.*, 2013; Reguera *et al.*, 2014).

4.- Los biomarcadores en la biomonitorización ambiental

Debido a los efectos deletéreos que las ficotoxinas como el OA pueden causar tanto en los ecosistemas marinos como en la salud humana, junto con las graves pérdidas económicas ocasionadas en la industria de la acuicultura o el ocio ya comentadas, han llevado al desarrollo no sólo de métodos de detección, sino también de programas de vigilancia o monitorización, que permitan identificar, seguir, regular y controlar las concentraciones de los contaminantes, con el fin de prevenir y controlar sus posibles efectos (Crathorne *et al.*, 1996). En la actualidad se están

desarrollando diversos métodos de monitorización, entre los que destacan los de tipo biológico, basados en la medida de los contaminantes a nivel de biota (Van der Oost *et al.*, 2003).

El uso de la monitorización biológica requiere del empleo de organismos centinela, también conocidos como bioindicadores, indicadores de bioacumulación o biomonitores. Estos organismos, deben cumplir una serie de requisitos para poder comportarse como tales: área de distribución conocida y global y de fácil acceso para el muestreo, estar disponible a lo largo del año a densidades suficientes para su manipulación y tener determinadas características que permitan su identificación taxonómica de manera sencilla (Kennish 1996; Jamil, 2001).

Debido a su sedentarismo, amplia distribución, carácter filtrador, alta tolerancia a condiciones de estrés ambiental, abundancia ecológica e importancia económica, los moluscos bivalvos, concretamente mejillones comunes (familia Mytilidae: *Mytilus edulis* o *M. galloprovincialis*) son uno de los organismos centinela más empleado en la actualidad (Farrington *et al.*, 1987), especialmente a partir de la implementación del Proyecto Internacional de Vigilancia con Mejillón (*International Mussel Watch Project*), promovido por la UNESCO en la década de los 60-70 (Goldberg, 1975) y aún vigente en el actualidad. Además de las características ya citadas, el mejillón presenta la ventaja de ser capaz de acumular en sus tejidos metales y contaminantes orgánicos presentes en el agua, a unas concentraciones mayores que las que poseen en el medio marino sin causarles la muerte, gracias a su gran potencial de detoxificación (Farrington *et al.*, 1987).

A pesar de que la monitorización biológica permite el conocimiento de los niveles de contaminantes tanto en el medio marino como en los organismos, estas herramientas no evalúan el riesgo que la presencia de estos contaminantes supone para éstos. Por esta razón, se han desarrollado metodologías más específicas que permitan determinar los efectos biológicos asociados a la contaminación y que establezcan relaciones entre el nivel de exposición y la severidad de sus efectos. Dentro de estas nuevas metodologías destacan los biomarcadores, entendidos como variaciones bioquímicas, celulares, fisiológicas o comportamentales que pueden ser medidas en los tejidos, en los fluidos corporales o a nivel de todo el organismo, proporcionando evidencias sobre la exposición y/o efectos de uno o más contaminantes (Livingstone, 1993; Fernández-Tajes *et al.*, 2010). Una de las principales ventajas del uso de biomarcadores como herramienta de detección y diagnóstico de los contaminantes es que los efectos de éstos a niveles de organización biológica baja (nivel celular, bioquímico o fisiológico) en general ocurren de un modo más rápido que en los niveles de organización superior (ecosistema), con lo que mediante los biomarcadores obtendremos información sobre los posibles riesgos de los contaminantes de una forma temprana, evitando tener que esperar a que el efecto sea visible en los ecosistemas. Esta detección temprana, puede combinarse con el uso de estrategias de biorremediación con el fin de recuperar el ecosistema antes de que el daño sea irreversible (Livingstone, 1993). De este modo, los biomarcadores tienen una doble función: permitir la detección de la contaminación de una manera temprana y estudiar los efectos que los contaminantes causan sobre los organismos a diferentes niveles.

Los biomarcadores, se pueden clasificar como: biomarcadores de exposición (detectan la interacción entre un compuesto y una molécula diana, indicando que el organismo ha estado en contacto con un agente contaminante) y biomarcadores de efecto (identifican alteraciones bioquímicas, celulares o tisulares asociadas con un daño en la salud del organismo) (Livingstone, 1993; Fernández-Tajes *et al.*, 2010).

Dentro de la búsqueda de biomarcadores útiles para la monitorización ambiental, en los últimos años se han desarrollado metodologías moleculares genómicas, proteómicas y metabolómicas. Estas nuevas técnicas, se basan en el estudio de la alteración de la expresión génica, de los niveles de proteínas o de la concentración de metabolitos como respuesta del organismo a la exposición de un determinado contaminante. La variación cuantificada en el organismo, será específica del contaminante y de su concentración, con lo que el patrón particular de respuesta, permite su uso como una "huella dactilar" para un determinado contaminante. Dentro de esta nueva generación de biomarcadores, los más empleados son los del tipo genómico, basados en la medida de la expresión diferencial de determinados genes (Schettino *et al.*, 2012). La obtención de dichos genes, se realiza por medio de *microarrays* de DNA, que permiten, de un modo eficiente, seleccionar de un grupo de cientos o incluso de miles de genes, sólo aquellos que responden al contaminante variando su

patrón de expresión (Lettieri *et al.*, 2006). Además del uso de los genes como biomarcadores, su patrón de expresión puede emplearse para identificar y estudiar el mecanismo de acción de los diferentes contaminantes sobre el organismo, así como los mecanismos moleculares implicados en la detoxificación o acumulación del contaminante por parte del organismo, muchos de los cuales son poco conocidos en la actualidad (Saavedra & Bachère, 2006).

La adopción de este tipo de biomarcadores basados en los cambios de expresión genética, ha sido posible gracias al incremento del número de genomas secuenciados, debido, en buena parte, al desarrollo de nuevas plataformas de secuenciación masiva (*Next-Generation Sequencing*, NGS), que han permitido que los métodos de secuenciación sean mucho más rápidos y baratos.

5.- Genómica y transcriptómica del mejillón

A pesar del creciente interés ya comentado del uso del mejillón como bioindicador de contaminación ambiental y el amplio conocimiento que se tiene de este a nivel ecológico, anatómico, morfológico y de cultivo, no se han realizado suficientes estudios genéticos, encontrándose actualmente su genoma sin secuenciar y disponiéndose de un número muy reducido de genes (Saavedra & Bachère, 2006). Esta falta de información sobre su genoma, se debe en parte a la gran cantidad de regiones repetidas no codificantes que éste contiene, su tamaño, al alto nivel de polimorfismo, que dificultan la secuenciación *de novo* y el ensamblado de las secuencias repetitivas y a la falta de genomas secuenciados de especies próximas, que puedan servir para la búsqueda de nuevos genes por homología (Suárez-Ulloa, 2013). Sin embargo, el conocimiento del genoma del mejillón ha aumentado en los últimos años, tras la secuenciación del genoma de la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) promovida por el Consorcio del Genoma de la Ostra (Oyster Genome Consortium, OGC) (Zhang *et al.*, 2012), así como por la implementación de técnicas NGS y pirosecuenciación *de novo*. (Craft *et al.*, 2010; Suárez-Ulloa *et al.*, 2013).

En cuanto al estudio del transcriptoma del mejillón, éste se ha basado en el estudio de genes diferencialmente expresados en respuesta a diferentes contaminantes y patógenos por medio de diferentes metodológicas como bibliotecas de cDNA, bibliotecas de hibridación sustractiva (*Suppression Subtractive Hybridization*, SSH), *microarrays* y el uso de la PCR en tiempo real como herramienta final de validación de los datos obtenidos por las anteriores técnicas (Venier *et al.*, 2003; Venier *et al.*, 2006; Tanguy *et al.*, 2008; Manfrin *et al.*, 2010; Flórez-Barrós, 2012; Varoto *et al.*, 2013). El desarrollo de este tipo de bibliotecas, ha permitido incrementar significativamente las colecciones de etiquetas de secuencia expresadas (*Expressed Sequence Tags*, EST), empleadas para la elaboración de *microarrays* y el descubrimiento de genes *de novo* y biomarcadores de contaminación marina (Suárez-Ulloa, 2013). Dentro del marco del estudio del transcriptoma del mejillón, es importante indicar el desarrollo de bases de datos específicas para este organismo durante los últimos años, entre las que destacan la Mytibase, que contiene un gran número de ESTs de *M. galloprovincialis* con una gran importancia en el desarrollo de plataformas de *microarrays* destinados a la vigilancia biológica de la contaminación marina (Venier *et al.*, 2009) y CHROMEVALOA, un recurso destinado a proporcionar una plataforma específica para la evaluación de la contaminación de OA en el medio marino basado en el transcriptoma asociado a la cromatina del mejillón *M. galloprovincialis* (Suárez-Ulloa *et al.*, 2013).

OBJETIVO

La finalidad de este trabajo es la validación de la expresión de los genes *ferritin*, *myticin c*, *hemolectin* y las regiones génicas *unigen1* y *unigen2* en branquia y hepatopáncreas del mejillón *Mytilus galloprovincialis* como respuesta a la baja exposición de la biotoxina ácido okadaico a una concentración de 200 células/mL del dinoflagelado *Prorocentrum lima* durante un día.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Material objeto de estudio

Para la realización de este trabajo se emplearon ejemplares de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819) procedentes de una población natural de roca no contaminada localizada en la playa de Valcobo (A Coruña), que se mantuvieron en tanques con 20 litros de agua de mar filtrada y aireación continua durante 72 horas, dentro de una cámara de fotoperiodo, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Además, con el fin de prevenir el posible estrés ambiental que los mejillones podrían sufrir, se empleó una temperatura del agua de 18 °C. Esta población original se dividió en dos grupos, uno control, que fue alimentado tres veces al día con algas de las especies *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suecica*, y un grupo tratado, que además fue alimentado con 200 cél/mL del dinoflagelado productor de OA *P. lima* durante un día.

2.- Extracción de RNA, purificación, cuantificación y control de calidad

Para iniciar la extracción del RNA total, se requirió de la obtención y preparación del tejido objeto de estudio, de modo que se diseccionó a los mejillones de cada uno de los grupos anteriormente definidos (control y tratado), extrayendo las branquias y los hepatopáncreas por separado. A su vez, los hepatopáncreas y branquias obtenidas de cada uno de los grupos, se distribuyeron en grupos de 10, constituyendo un *pool*. De este modo, tras finalizar la disección se obtuvieron *pools* de branquia/hepatopáncreas de individuos tratados/control constituidos cada uno de ellos por los tejidos de 10 individuos. El tejido de cada *pool*, se pesó para determinar el volumen de TRIzol® Reagent (Invitrogen), indicado por el fabricante, que fue necesario añadir al mismo para una mejor conservación del RNA, ya que, cuando se disecciona al animal, tiene lugar una autólisis celular en los tejidos por acción de enzimas endógenas como las RNAsas que actúan degradando el RNA. Además, el empleo de este reactivo, permite conservar las muestras durante casi un mes a temperaturas de -60 -80 °C o incluso un año una vez que se ha completado todo el proceso de extracción. Posteriormente el contenido de cada tubo se homogenizó con un homogenizador (Ultra-Turrax® T10 basic IKA Labortechnik). Durante todo este procedimiento se requirió el uso de material autoclavado y limpio con RNaseZap® (Ambion), así como el uso de puntas con filtro de RNAsas para garantizar la estabilidad del RNA y evitar su degradación por posibles contaminaciones con RNAsas ambientales, que se localizan por las superficies de los lugares en los que se lleva a cabo el trabajo y en las herramientas que se utilizan. Además, debido a la naturaleza tóxica de los productos empleados, se trabajó dentro de una campana, con las protecciones convenientes.

Con el material anteriormente preparado, se realizaron una serie de extracciones con el fin de obtener diez réplicas biológicas de glándula (cinco de ellas control y otras cinco tratadas) y diez réplicas biológicas de hepatopáncreas, con el mismo esquema que las del anterior tejido. Para ello, el contenido de cada *pool* se dividió en 5 que se centrifugó a 12000 *xg* durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes obtenidos se recogieron y se dejaron a temperatura ambiente durante 5 min. Pasado este tiempo se añadió 0,2 mL de triclorometano a cada uno de los tubos y se agitó en vórtex 15 segundos. Posteriormente se dejó incubar a temperatura ambiente durante 2-3 min y se centrifugaron a 12000 *xg* 15 min a 4 °C.

La adición de triclorometano y el posterior centrifugado, provoca que la disolución se divida en dos fases claramente diferenciadas (fase acuosa y fase orgánica), separadas por una fina capa blanquecina. La fase acuosa, la superior, contiene todo el RNA de la muestra, con lo que se procedió a su transferencia a nuevos tubos, mientras que la fase orgánica contiene proteínas y la interfase DNA. La adición de 0,5 mL de isopropanol frío, produjo el precipitado del RNA, que forma un *pellet* en la pared y el fondo del tubo. Tras esto, se realizó una incubación de 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron los tubos a 12000 *xg* 10 min a 4 °C.

Eliminamos el sobrenadante resultante, añadiendo 1 mL de etanol al 75% al *pellet* que contenía el RNA precipitado. Seguidamente se vorteoó y se centrifugó a 7500 *xg* durante 5 min a 4 °C.

Se eliminaron los sobrenadantes y los restos de etanol y se dejaron secar a temperatura ambiente. El *pellet* se resuspendió en 100 µL de agua Milli-Q autoclavada libre de RNAsas y se incubó durante 10 min a 60 °C para ayudar a la resuspensión.

Para asegurar una calidad óptima de RNA, se hizo un paso más de precipitación con 1/10 del 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 $\times g$ 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se realizaron dos lavados de etanol al 75% como los descritos anteriormente.

Para comprobar la calidad final del RNA extraído de cada una de las 10 muestras (*stock*), se empleó el espectrofotómetro Nanodrop® (Thermo Scientific) y el software asociado del fabricante, controlando que la relación de absorbancias obtenida a longitudes de onda de 260/280 nm se encontraban entre 1,8 y 2 y que la relación de absorbancias de 260/230 nm era mayor de 1,8 para todas las muestras con el fin de comprobar si las muestras eran puras, es decir, sin trazas de proteína o contaminantes orgánicos, derivados de la extracción del RNA. Así mismo, con el mismo aparato y software, se realizó una medida de la concentración del RNA total (ng/ μ L) de cada una de las muestras con el fin de poder realizar alícuotas de 100 ng/ μ L, que serían utilizadas para la síntesis de cDNA. Para la realización de las alícuotas, se empleó agua Milli-Q autoclavada libre de RNAsas.

3.- Síntesis de cDNA

Para obtener las secuencias completas de cDNA, que se emplearían para la PCR a tiempo real así como para validar la efectividad de los *primers* diseñados, se realizó su síntesis por transcripción inversa, por medio del kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche Applied Science), con el que se obtienen cadenas simples de cDNA que pueden ser usadas directamente para la amplificación de genes específicos por medio de *primers* en termocicladores convencionales o en termocicladores específicos de PCR a tiempo real, gracias a su alta sensibilidad. Para realizar la síntesis de cDNA, se empleó el sistema de *priming* basado en el uso de dos *primers* y una reverso transcriptasa, *Transcriptor Reverse Transcriptase*, de gran sensibilidad, (recomendada para la obtención de cDNA que pueda ser usado para una posterior PCR a tiempo real) y gran termoestabilidad, (útil para moldes con alto contenido en GC, que requieren altas temperaturas, como era el caso de nuestro RNA, procedente de mejillón cuyo genoma es rico en GC). Los dos *primers* empleados fueron el *Oligo(dT)₁₈ Primer* que se une al comienzo de la cola poli-A del RNA, garantizando la formación de toda la longitud del cDNA y el *Random Hexamer Primer*, que se une a lo largo de toda la extensión del RNA y evita problemas de representación, especialmente con los extremos 5'.

Se partió de 1 μ g RNA al que se le añadió 2 μ L de *Random Hexamer Primer* y 1 μ L de *Oligo(dT)₁₈ Primer*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, estas se pusieron 10 min a 60 °C; mientras que por otro lado, se mezclaron 4 μ L de *Transcriptor RT Reaction Buffer (5x)*, 2 μ L de dNTP 10 mM, 0,5 μ L de *Protector RNase Inhibitor* y 0,5 μ L *Transcriptor Reverse Transcriptase*. Se unieron las dos preparaciones y la reacción se introdujo en el termociclador *My Cycler* (Bio-Rad) con el programa de amplificación indicado por el fabricante.

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

Las secuencias seleccionadas para su análisis mediante PCR en tiempo real se obtuvieron a partir de una genoteca normalizada de branquia procedente de individuos alimentados con 200 cél/mL de *P. lima* durante un día, disponible en el laboratorio. La elección de dichas secuencias se realizó en base a su significativa sobrerrepresentación en la genoteca normalizada o por su homología con genes relacionados con algún tipo de componente celular, función molecular o proceso biológico interesante, como su relación con la inmunidad. Los *Expressed Sequence Tags* (ESTs) seleccionados fueron *hemolactin*, *ferritin* y *myticin C*, todos ellos relacionados con la inmunidad y las regiones génicas no anotadas en la genoteca, pero sobrerrepresentadas significativamente fueron el *unigen1* y el *unigen2*. Mientras que los genes de referencia empleados para el posterior análisis comparativo, fueron los genes *housekeeping* o constitutivos *gapdh* y *rps4*, ya comprobados en trabajos previos (Martínez-Escauriaza, 2013).

Para el diseño de los *primers* específicos para cada una de las secuencias se empleó el *software* basado en web ProbeFinder de Roche Applied Science, el cual a partir de la información aportada por el usuario (secuencia en formato FASTA y tipo de organismo), diseña parejas de *primers* (*forward* y *reverse*) específicas, adecuadas para ensayos de PCR en tiempo real por medio del *software* Primer3. En nuestro caso fueron empleados los valores que aparecen de forma predeterminada en el *software*, debido a que éstos ya están optimizados para ensayos del tipo *PCR Real-Time*, permitiendo obtener los mejores resultados sin ninguna modificación adicional.

Asimismo, todas las parejas de *primers* diseñadas por ProbeFinder son comprobados virtualmente por medio del algoritmo *in silico* PCR, que otorga una puntuación a cada una de las parejas de *primers* obtenidas de cada ensayo, permitiendo así ordenarlas en función de su “efectividad”, con el fin de facilitar al usuario la selección de las mejores entre todas las parejas diseñadas por el software. Además, de lo indicado, el programa acompaña cada pareja de *primers* diseñada con información relevante de éstas, como su longitud y secuencia, posición en la secuencia del gen, temperatura de fusión o T_m , porcentaje de guanina-citosina (%GC) y, por último, el tamaño (en nucleótidos) y las bases que conforman la secuencia amplificada (*amplicon*).

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* diseñados por medio de una PCR convencional para cada uno de los tejidos objeto de estudio (glándula y hepatopáncreas), con el fin de comprobar si únicamente se amplificaba la secuencia deseada. Para esta evaluación, se utilizaron dos muestras de cDNA control y dos muestras de cDNA tratado, de cada tejido para cada pareja de *primers* y el kit *Supreme NZYTaQ DNA polymerase* (NZYTech).

La reacción se generó en un volumen final de 12,5 μ L para cada una de las muestras, tras añadir 7,25 μ L de agua Milli-Q autoclavada, 1,25 μ L de *Reaction buffer (10X)*, 1 μ L de *dNTPs mix (del kit de TaKaRa)*, 0,875 μ L de $MgCl_2$ 50mM, 0,5 μ L de *primer forward*, 0,5 de *primer reverse*, 0,1 μ L de *Supreme NZYTaQ DNA polymerase* y 1 μ L de cDNA. Tras obtener el volumen final de 12,5 μ L para cada muestra, éstas se introdujeron en el termociclador *My Cyclor* (Bio-Rad) con el siguiente programa, 2 min de desnaturalización inicial a 94°C; seguidos por 35 ciclos de amplificación, con una desnaturalización a 94°C de 30s, un anillado a 55°C durante 30 s, y una extensión a 72°C durante otros 30 s. Además, se hizo una extensión final a 72°C durante 7 min.

En todas las reacciones de PCR se hicieron controles negativos o “blancos”, sin cDNA con el fin de comprobar la posibles contaminaciones externas.

6.- Electroforesis de los productos de amplificación

Como paso siguiente en la comprobación de la validez de los *primers* diseñados, los cDNAs obtenidos en la PCR convencional fueron analizados por electroforesis, técnica que permite testar que el cDNA resultante de la amplificación se corresponde con el tamaño del amplicón esperado para cada gen, así como la existencia de productos no específicos. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 2,5%, y fue teñida con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 μ g/mL durante 15 min. El bromuro de etidio es un agente intercalante con alta afinidad para unirse a los ácidos nucleicos de doble cadena que bajo luz ultravioleta es excitado, permitiendo ver los fragmentos que han sido separados por electroforesis.

Para realizar la carga en los pocillos del gel, las muestras se mezclaron previamente con un tampón de carga con azul de xianol, azul de bromofenol y glicerol en relación 1:10, dejándose correr a 80mV. Como marcador de peso molecular, se empleó el *DNA Molecular Weight Marker XIII* (Roche Applied Science), que permite distinguir bandas de un tamaño entre 50-750 pares de bases, con un intervalo de 50 pares de bases entre cada una de las bandas.

Para la visualización del gel teñido se empleó el equipo Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (BIO-RAD), un transiluminador conectado a una cámara y el software Quantity One Software for Gel Doc XR (BIO-RAD), que permitió conservar las imágenes obtenidas.

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

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real o *Real Time-PCR*) es una técnica que procesa los datos a medida que progresa la PCR, combinando la amplificación y la detección en un solo paso, mediante la utilización de diferentes fluoróforos que hacen posible la correlación entre la concentración del producto de la PCR y la intensidad de fluorescencia generada tras cada copia del DNA molde (Higuchi et al., 1993). La PCR en tiempo real, presenta ciertas ventajas frente a otros métodos para cuantificar la expresión génica, entre las que destacamos una baja cantidad de mRNA inicial para realizar la cuantificación-amplificación, la alta sensibilidad de la técnica (puede detectar una única copia de un determinado transcrito) y la rapidez y sencillez para

realizar el análisis (Heid *et al.*, 1996). Debido a todas estas ventajas, la PCR en tiempo real, se ha convertido en una de las principales herramientas empleadas para la cuantificación de ácidos nucleicos y genotipado. Prueba de ello, es el incremento casi exponencial de las publicaciones que han utilizado esta técnica, (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013) desde su primera aparición en el año 1996 en los trabajos de Heid y colaboradores (Heid *et al.*, 1996)

Los termocicladores para llevar a cabo la reacción de PCR en tiempo real deben ser capaces de realizar simultáneamente la emisión y detección de energía a una determinada longitud de onda, así como de mantener una temperatura constante entre todos los pocillos de muestra, ya que de lo contrario, provocaría la existencia de diferentes eficiencia de amplificación de PCR dentro de las muestras de un mismo experimento. Además, el equipo debe contar con un *hardware* y un *software* adecuados para simplificar el análisis de los datos (Reece, 2004).

La fluorescencia que es monitorizada a lo largo del proceso de la PCR en tiempo real puede ser de detectada por estrategias inespecíficas independientes de la secuencia diana (agentes intercalantes) o por sondas secuencia específicas marcadas con fluorocromos (Shipley, 2006; Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013).

Dentro de la estrategia inespecífica, encontramos agentes intercalantes como el bromuro de etidio, el YO-PRO-1, el BEBO o el SYBR Green I, uno de los principales agentes empleados para las técnicas de PCR en tiempo real (Shipley, 2006). El SYBR Green I, se une al surco menor del DNA de doble cadena, independientemente de la secuencia y bajo una excitación, emite fluorescencia. La intensidad de esta fluorescencia será dependiente del grado de unión con el DNA, de modo que cuando el fluoróforo se encuentre asociado a DNA, la intensidad emitida será mayor que cuando éste se encuentre libre. De este modo, el aumento de la cantidad de DNA en cada ciclo, llevará asociado un incremento en la cantidad de SYBR Green I unido al DNA y con ello un aumento proporcional de la fluorescencia emitida por el fluoróforo (Figura 5).

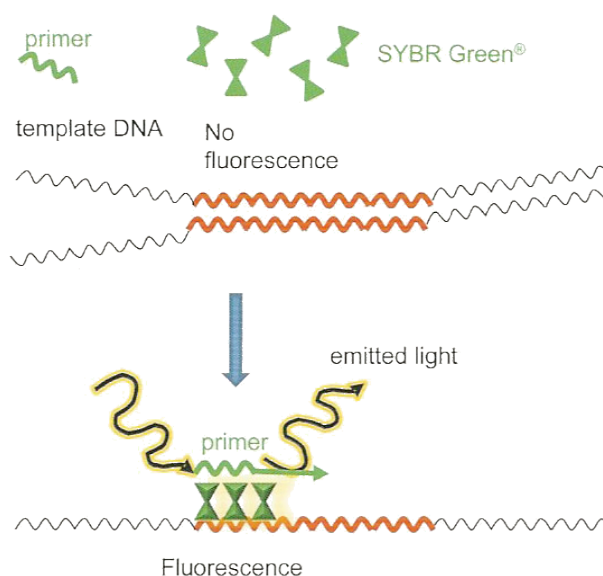


Figura 5: Principio de detección usando SBYR Green I. Tomado de: Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013.

Las ventajas del empleo de SYBR Green I es su afinidad por el DNA de doble cadena, lo cual hace que pueda no sea necesario diseñar sondas específicas, abaratando el coste de la técnica. Sin embargo, esta inespecificidad de secuencia también puede suponer un problema, ya que tanto los productos de interés, como los no deseados (*primer dimers* u otros productos inespecíficos), emitirán señal fluorescente. Esto puede solucionarse mediante el análisis de la curva de desnatulización o *melting* del producto de PCR. La temperatura de *melting* (T_m) de un amplicón

depende de su tamaño y de su composición nucleotídica, con lo que cada tipo de amplicón tendrá una T_m diferente, permitiendo distinguir de una manera sencilla la señal fluorescente de un producto de interés de la de uno que no lo es, debido a que estos últimos poseen una T_m menor (Ponchel, 2006) (Figura 6).

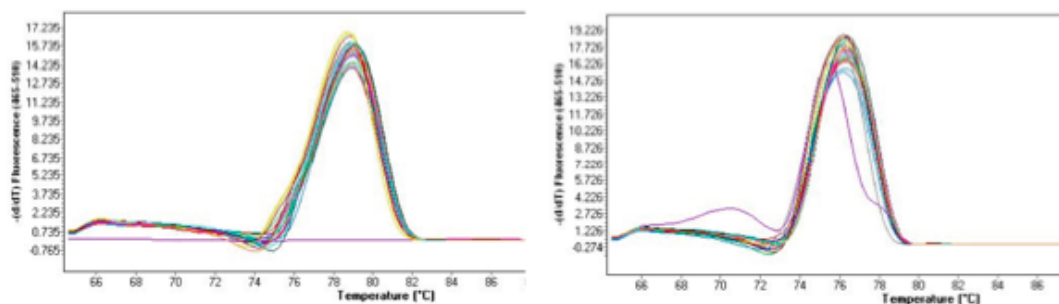


Figura 6: Gráficas de T_m mostrando la diferencia cuando no existen productos inespecíficos (izquierda) y cuando si existen (derecha).

En el caso de las sondas específicas, estas están marcadas con dos fluorocromos uno donador (*reporter*) y otro aceptor (*quencher*), y se basan en el incremento de fluorescencia en ambas moléculas como consecuencia de la transferencia de energía fluorescentes por resonancia (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), que varía según la proximidad de ambos fluorocromos. Dentro de este tipo de sondas, las más utilizadas son las sondas TaqMan (sondas de hidrólisis), las *Molecular Beacons* (sondas de horquilla o hibridación) y las sondas *Scorpion*. (Reece, 2004).

El resultado de la PCR se puede ver en una curva de amplificación elaborada por el software conectado con el termociclador (Figura 7). Esta representación gráfica se obtiene de enfrenar la fluorescencia emitida por el fluoróforo y leída por el termociclador (eje de ordenadas), frente a los sucesivos ciclos de amplificación (eje de abscisas). La curva descrita tras los ciclos, se puede dividir generalmente en tres fases diferentes. La primera de las fases, iniciación, tiene lugar durante los primeros ciclos de PCR y se caracteriza por bajos niveles de fluorescencia emitida, de manera que no hay cambios significativos en la señal de fluorescencia. Esta etapa permite el cálculo de la fluorescencia basal o *baseline*. La segunda fase, denominada logarítmica o exponencial, se caracteriza por un incremento exponencial de la fluorescencia, que se estanca tras una serie de ciclos, llegando a la tercera fase o fase de meseta. Es importante destacar que la cuantificación, sólo tiene lugar en la segunda de las fases, cuando la fluorescencia emitida por el fluoróforo, supera un determinado valor, conocido como fluorescencia umbral (*threshold*). Este valor, determinado automáticamente o manualmente y fijado en la etapa exponencial, por encima de la línea base, determina el nivel de fluorescencia significativamente superior a la fluorescencia basal y marca el punto a partir del cual comienza el aumento exponencial de la fluorescencia. Es importante que la cuantificación sólo se realice durante esta fase exponencial, ya que es el único momento en el que la relación entre la fluorescencia emitida y el producto de la PCR es directamente proporcional. El valor umbral, además de indicar un cambio en la fluorescencia, nos permite el cálculo de un parámetro importante para la realización una cuantificación relativa, el ciclo umbral o C_T , que puede ser definido como el ciclo en el que el valor de la fluorescencia supera el umbral. (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013).

La expresión diferencial de los genes, puede ser analizada mediante diferentes metodologías. Una de las empleadas es la cuantificación relativa, que consiste en analizar los cambios de expresión de los genes diana bajo dos condiciones (control y tratadas) en comparación con uno o más genes de referencia o constitutivos, cuya expresión es la misma en ambas condiciones. Dentro de la cuantificación relativa, el modelo matemático usado para obtener las expresiones puede ser diverso, siendo el método de la comparación de C_T , el más utilizado (Pfaffl, 2006).

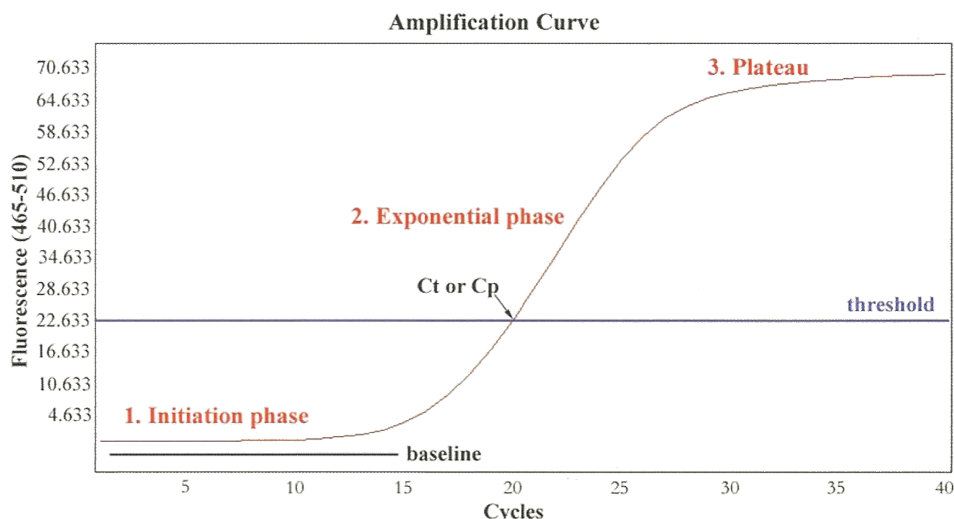


Figura 7: Fases de una curva de amplificación de PCR *Real-Time*. En rojo la curva de amplificación de una positiva. En azul la fluorescencia umbral (*threshold*). En negro la fluorescencia basal (*baseline*). La gráfica muestra también el ciclo umbral o C_T . Tomada de: Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013.

Para la cuantificación de la expresión diferencial de los genes seleccionados se realizaron PCR cuantitativas a tiempo real en el equipo *Light Cycler 96® Real Time PCR System* (Roche Applied Science). Las placas de 96 pocillos específicas para este equipo se diseñaron de forma que cada una de las muestras contase con una réplica técnica. Además, cada placa diseñada contaba con dos genes de referencia y un control negativo para cada uno de los genes objeto de estudio.

Para llevar a cabo la monitorización, se empleó la medida de la señal fluorescente del agente intercalante SYBR Green por medio del uso del kit *FastStart Essential DNA Green Master* (Roche Applied Science). La mezcla de la reacción se compuso de 10 μ l de *Light Cycler 480 SYBR Green I Master* (Roche Applied Science), 0,8 μ L de cada *primer* a una concentración de 10 μ M, 6,4 μ L de agua Milli-Q autoclavada y 1,8 μ L de cDNA a una concentración de 2 μ g/ μ L procedente de branquia y hepatopáncreas expuestas a 200 células/mL de *P. lima* durante un día.

El programa de PCR utilizado consistió en un ciclo de desnaturalización inicial 10 min de a 95 °C; seguidos por 45 ciclos de amplificación, con una desnaturalización a 95°C de 10s, un anillado a 60°C durante 10 s, y una extensión a 72°C durante otros 10 s. El cálculo de las curvas de *melting* para comprobar la especificidad de la reacción, se realizó por medio del *software LightCycler Software 1.5.0* (Roche Applied Science). El número de ciclos de amplificación necesarios para alcanzar el *threshold cycle numer* (C_T), fue calculado por medio del mismo *software*.

Los valores de C_T de las muestras anteriormente obtenidos, se analizaron con el *software qBasePlus* (<http://www.biogazelle.com/products>) usando los genes *gapdh* y *rps4* como genes constitutivos o referencia en ambos tejidos (Martínez-Escauriaza, 2013). El método de cuantificación de la expresión génica fue relativa y se realizó bajo los siguientes parámetros: eficiencia de la PCR (E) de 2 (100% de eficiencia); estrategia de comparación de las C_T por medio de medias aritméticas; la variabilidad entre réplicas no superior a 0,5 y la C_T máxima de 35. Asimismo, el test estadístico empleado para la obtención de los p-valores asociado a cada uno de los genes fue la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Además de esto, para facilitar la comprensión de los resultados obtenidos, se normalizaron los valores de expresión de cada gen y se representaron, en escala logarítmica, mediante gráficos de barras por medio del *software estadístico Microsoft Excel 2008* para Mac Versión 12.3.6 (Microsoft Corporation).

RESULTADOS

1.- Selección de secuencias y diseño de *primers*

Las secuencias de los *primers* diseñados para evaluar los patrones de expresión causados por la presencia del OA, de los 3 genes, las 2 regiones génicas y los genes de referencia en branquia y hepatopáncreas se recogen en la Tabla 1, en la que se presentan los genes y regiones génicas seleccionadas, la secuencia de los *primers* utilizados para su amplificación y su tamaño de amplicón.

Tabla 1: Genes seleccionados para su evaluación por medio de PCR en tiempo real

Gen	Primer forward	Primer reverse	Amplicón (nt)
<i>unigen1</i>	AAAACAATGATTCGTGGATAACAA	AGTGTTCCTTCATTGGCATGTTT	109
<i>unigen2</i>	TGAAGCTAAAAAGGAAGAACTTGG	TGCACAAATAAGTGAAAAATTGTG	100
<i>ferritin</i>	GTTTGAGCTGGGTGATGTGA	TGTGTGATTTTCTGGAGTCTGAA	84
<i>gapdh</i>	AGGAATGGCCTTCAGGGTAC	TCAGATGCTGCTTTAATGGCTG	114
<i>rps4</i>	TGGGTTATCGAGGGCGTAG	TCCCTTAGTTTGTGAGGACCTG	138
<i>myticin c</i> ⁽¹⁾	ACAACTTCATCCTGGCAAAA	AGTGCCAATGGAGACTCAGC	67
<i>myticin c</i> ⁽²⁾	TCCTCAAACTCAAAACATTCAAC	CCAACAATGACTGCCACTACA	71
<i>hemolectin</i>	AGCTGCAACAGCTGTAGCACAA	TGTTTGATGCTTGTGCCTGT	65

⁽¹⁾El *primer* fue empleado para la amplificación del cDNA de hepatopáncreas

⁽²⁾El *primer* fue empleado para la amplificación del cDNA de branquia

2.- Evaluación de la eficacia de los *primers*

La evaluación de la eficacia de los *primers* por medio de un gel de agarosa se recoge en las Figuras 8 y 9, en las que se observa como el fragmento resultante de la amplificación de cada gen en ambos tejidos se corresponde con el tamaño esperado.

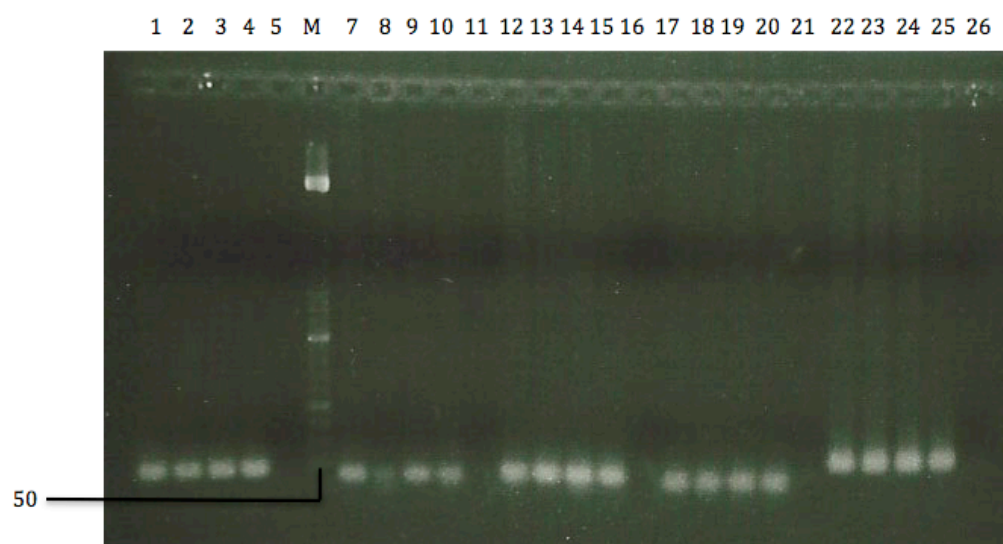


Figura 8: Gel de electroforesis en agarosa al 2,5% para el análisis de la eficacia de los *primers* diseñados en el tejido de branquia. Carriles 1-4: *ferritin*, carriles 7-10: *myticin c*, carriles 12-15: *unigen2*, carriles 17-20: *hemolectin*, carriles 22-25: *unigen1*. Carriles 5,11,16,21,26: blancos. Carril M: *Marker XIII*.

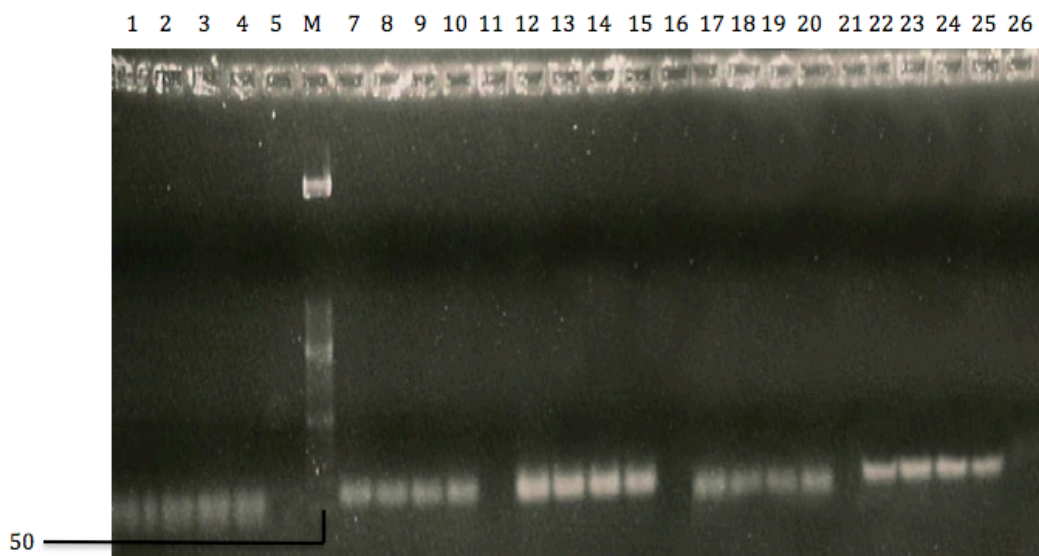


Figura 9: Gel de electroforesis en agarosa al 2,5% para el análisis de la eficacia de los primers diseñados en el tejido de hepatopáncreas. Carriles 1-4: *hemolectin*, carriles 7-10: *unigen1*, carriles 12-15: *myticin c*, carriles 17-20: *ferritin*, carriles 22-25: *unigen2*. Carriles 5,11,16,21,26: blancos. Carril M: *Marker XIII*.

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

El estudio de los genes mediante PCR en tiempo real en individuos tratados con *P. lima* a una concentración de 200 cél/mL durante un día permitió observar cómo los diferentes genes presentaban distintos patrones de sobreexpresión o represión, variables según el tejido estudiado. Los p-valores asociados a cada uno de los genes objeto de estudio en ambos tejidos, arrojados por la prueba de U Mann-Whitney, se recogen en las Tablas 2 y 3:

Tabla 2: p-valores asociados a la expresión de los genes y regiones génicas objeto de estudio en branquia de mejillones alimentados durante un día con 200 cél/mL de *P.lima*.

Gen	Tejido	p-valor
<i>unigen1</i>	Branquia	0,0079*
<i>unigen2</i>	Branquia	0,0159*
<i>ferritin</i>	Branquia	0,0592
<i>myticin c</i>	Branquia	0,7302
<i>hemolectin</i>	Branquia	0,0317*

(*)Se consideró la presencia de significación estadística cuando el p-valor obtenido era inferior a 0,05.

Tabla 3: p-valores asociados a la expresión de los genes y regiones génicas objeto de estudio en hepatopáncreas de mejillones alimentados durante un día con 200 cél/mL de *P.lima*.

Gen	Tejido	p-valor
<i>unigen1</i>	Hepatopáncreas	0,4127
<i>unigen2</i>	Hepatopáncreas	1,0000
<i>ferritin</i>	Hepatopáncreas	0,9480
<i>myticin c</i>	Hepatopáncreas	0,0004*
<i>hemolectin</i>	Hepatopáncreas	0,7302

(*)Se consideró la presencia de significación estadística cuando el p-valor obtenido era inferior a 0,05.

Los datos obtenidos por medio del *software qBasePlus* fueron representados de forma gráfica, tal y como se puede ver en las Figuras 10 y 11, en donde las sobreexpresiones y represiones significativas han sido marcadas con un asterisco.

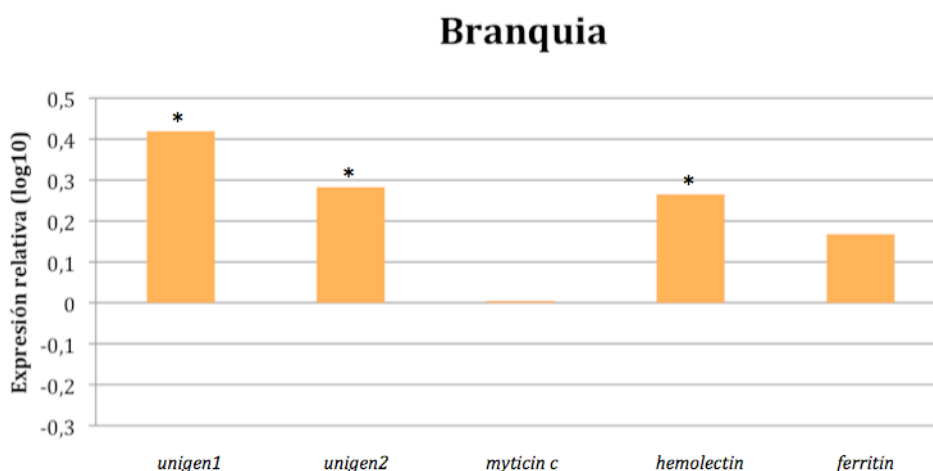


Figura 10: Expresión cuantitativa de los genes y regiones génicas seleccionados de la genoteca de branquia normalizada en branquia de mejillones alimentados durante un día con 200 cél/mL de *P.lima*. P-valor<0,05.

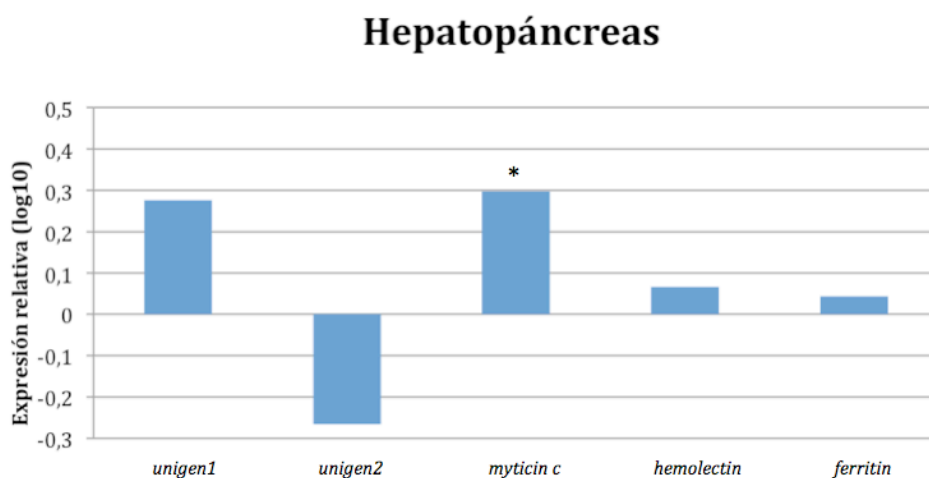


Figura 11: Expresión cuantitativa de los genes y regiones génicas seleccionados de la genoteca de branquia normalizada en hepatopáncreas de mejillones alimentados durante un día con 200 cél/mL de *P.lima*. P-valor<0,05.

En base a los resultados resumidos en las Tablas 2 y 3 y en las Figuras 10 y 11 el patrón de expresión de cada uno de los genes y regiones génicas objeto de estudio fue el siguiente:

La región génica *unigen1*, seleccionada por encontrarse sobrerrepresentada significativamente en la genoteca normalizada, muestra un patrón de expresión significativo en la branquia de los individuos alimentados con 200 cél/mL de *P.lima* (p-valor= 0,0079), mientras que en el hepatopáncreas, el patrón de expresión no es significativo (p-valor= 0,4127).

La región génica *unigen2*, seleccionada por encontrarse sobrerrepresentada significativamente en la genoteca normalizada, muestra un patrón de expresión significativo en la branquia de los

individuos alimentados con 200 cél/mL de *P.lima* (p-valor= 0,0159). Sin embargo, el patrón de expresión no es significativo en el hepatopáncreas (p-valor=1,0000).

El gen *ferritin*, seleccionado por estar relacionado con la respuesta inmune del organismo, muestra un patrón de expresión no significativo en la branquia de los individuos alimentados con 200 cél/mL de *P.lima* (p-valor= 0,0592), ocurriendo lo mismo en el hepatopáncreas (p-valor= 0,9480).

El gen *myticin c*, seleccionado por estar relacionado con la respuesta inmune del organismo, muestra un patrón de expresión no significativo en la branquia de los en los individuos alimentados con 200 cél/mL de *P.lima* (p-valor= 0,7302), mientras que en el hepatopáncreas se encontraron diferencias significativas en el patrón de expresión de este gen (p-valor= 0,0004).

Por último, el gen *hemolectin*, seleccionado por estar relacionado con la respuesta inmune del organismo, muestra un patrón de expresión significativo en los en los individuos alimentados con 200 cél/mL de *P.lima* (p-valor= 0,0317). Sin embargo, el patrón de expresión de este gen, no es significativo en el hepatopáncreas (p-valor= 0,7302).

Asimismo, la Figura 12, compara los patrones de expresión de los genes objeto de estudio en ambos tejidos de forma simultánea, observándose como la región génica *unigen1*, presenta un patrón de expresión similar en ambos tejidos, siendo ligeramente superior en branquia. Este comportamiento de expresión, también se puede observar en los genes *hemolectin* y *ferritin*, mientras que la región génica *unigen2* y el gen *myticin c*, presentan un patrón de expresión diferente. Así, la región génica *unigen2*, se sobreexpresa en branquia y se reprime en hepatopáncreas, siendo el único de los genes estudiados que experimenta una represión de su expresión debida a la exposición al AO. Por otro lado, el gen *myticin c*, se sobreexpresa en ambos tejidos, pero el valor alcanzado en el hepatopáncreas supera al valor alcanzado en branquia, mostrando un patrón de expresión “invertido” respecto al resto de los genes y regiones génicas estudiados.

Branquia y hepatopáncreas

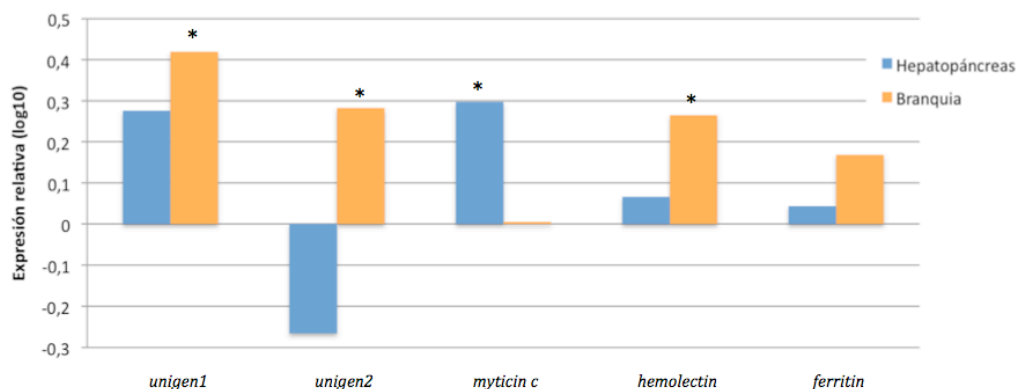


Figura 12: Expresión cuantitativa de los genes y regiones génicas seleccionados de la genoteca de branquia normalizada en hepatopáncreas y branquia de mejillones alimentados durante un día con 200 cél/mL de *P.lima*. P-valor<0,05.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, muestran una clara diferencia de expresión entre la branquia y el hepatopáncreas en los genes y regiones génicas estudiadas. Así, en branquia, el gen *hemolectin* y las regiones génicas *unigen1* y *unigen2*, han manifestado una sobreexpresión significativa, mientras que los genes *myticin c* y *ferritin* no han mostrado este patrón significativo. En hepatopáncreas, los genes *ferritin* y *hemolectin* y las regiones génicas *unigen1* y *unigen2*, no reflejan sobreexpresión significativa, siendo el gen *myticin c*, el único que si lo ha hecho.

El diferente nivel de expresión observado en los dos tejidos objeto de estudio, puede deberse a que a pesar de que ambos tejidos tienen en común la interacción con el ambiente, estos presentan funciones muy diferentes ante la entrada del OA en el mejillón. De esta forma, los filamentos que conforman las branquias representan el primer punto de contacto entre la toxina presente en las microalgas y el mejillón, al retener las partículas en suspensión y arrastrarlas hacia los palpos labiales que rodean la boca. Debido a ser el primer punto de contacto con la toxina y no estar implicado de manera directa en los procesos de detoxificación y acumulación de la misma, la branquia sería más susceptible a este compuesto, con lo que la branquia actuaría como un órgano centinela del contaminante, al sobreexpresar ciertos genes implicados en mecanismos de defensa y/o en reajustes fisiológicos, como respuesta a la exposición del mejillón al OA. Por su parte, el hepatopáncreas, órgano de importancia en los procesos de digestión, es el encargado de la detoxificación de los compuestos, así como de la acumulación de los mismos, con lo que éste estará adaptado a la presencia de contaminantes, como la biotoxina objeto de estudio, de modo que la baja concentración y el breve tiempo de exposición de la misma, no deberían producir cambios en la expresión de los genes de este tejido, tal y como recogen los resultados obtenidos (Blanco *et al.*, 2007).

El gen *ferritin*, no sobreexpresado significativamente en ninguno de los tejidos, codifica para la Ferritina, una proteína intracelular de localización ubicua encargada del secuestro de hierro de una forma controlada; la cantidad de Ferritina refleja la cantidad de hierro secuestrado, y aumenta sus niveles en presencia de una infección, y también en respuesta a una situación de estrés. En algunos invertebrados, se ha demostrado que la cantidad expresada de esta proteína está directamente relacionada con los mecanismos innatos de defensa inmune, pero hasta la fecha estos procesos no se han investigado en profundidad en moluscos, habiendo sido aislado solamente a partir de ostras, caracoles, vieiras y abulones (Kong *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012). Los resultados de nuestro estudio, con el gen *ferritin* no sobreexpresado en ninguno de los tejidos de mejillones alimentados con 200 células/mL de *P.lima* durante un día, discrepan de los obtenidos en trabajos anteriores desarrollados en este mismo laboratorio, en los que se obtuvo una sobreexpresión significativa del gen para todos los tiempos y concentraciones evaluadas (Flórez-Barrós, 2012) y de los realizados por Li y colaboradores en vieira tras una infección bacteriana (2012) y Kong y colaboradores en crustáceos tras procesos infecciosos (2010). Esta discrepancia, podría ser explicada por el tejido empleado para la evaluación de la expresión del gen, ya que en todos los trabajos anteriormente mencionados fueron usados hemocitos, mucho más relacionados con la respuesta inmune que la branquia o el hepatopáncreas. A pesar de esto, tal y como indicamos antes, es importante destacar que la expresión del *ferritin* en branquia es casi significativa, con lo que se requeriría un análisis más exhaustivo para poder indicar si este gen podría ser un buen marcador de contaminación temprana.

El gen *myticin c*, sobreexpresado significativamente en el hepatopáncreas, codifica para el Myticin C, un péptido que forma parte del grupo de los péptidos antimicrobianos o AMPs, implicados en la respuesta inmune del organismo frente a microorganismos. De los casi 41000 AMPs que han sido estimados en los organismos multicelulares, en *M. galloprovincialis* destacan tres subtipos: las *defensins*, los *mytilins* y *myticins*. (De Zoysa, 2013). Dentro de los *myticin* descritos en mejillón, se han encontrado tres isoformas diferentes (A, B y C), siendo la isoforma C la más expresada en adulto y la más polimórfica a nivel del mRNA. Estudios recientes sobre el Myticin C, han demostrado que este puede tener un papel significativo en la respuesta inmune contra patógenos y agresiones externas, además de localizar su expresión en hemocitos del músculo, del tejido conectivo, de la gónada y de las branquias, siendo en este último tejido especialmente significativa su expresión. El hecho de que la branquia sea el primer tejido que está en contacto con los posibles patógenos y la sobreexpresión de este péptido en este órgano, sugiere que el Myticin C, esté implicado en la

respuesta inmune rápida (Balseiro *et al.*, 2011). El resultado del patrón de expresión obtenido por Balseiro y colaboradores, contrasta con el presentado en este trabajo, en el que su sobreexpresión no se localiza en la branquia, sino en el hepatopáncreas (Figura 12). Una posible razón de este resultado puede deberse a una posible inespecificidad del *primer* empleado para amplificar el *myt1c* en branquia, ya que a pesar de haber sido diseñado y obtener una puntuación satisfactoria en el programa ProbeFinder, la secuencia amplificada por el mismo es poco específica, tal y como muestran los datos de la expresión de este gen en branquia (Figura 10), en donde se observa como el valor de expresión relativa en escala logarítmica es muy bajo. Esta idea puede ser reforzada si se tienen en cuenta los resultados obtenidos tras el diseño y prueba de un segundo par de *primers* para este gen en hepatopáncreas (Figura 11). En este tejido, se puede observar como el patrón de expresión cambia drásticamente, con un resultado de sobreexpresión significativa, a pesar de que en este tejido no se haya descrito, *a priori*, dicho comportamiento. Debido a lo comentado y a la posible inespecificidad del *primer* empleado para la branquia, se requeriría un estudio más minucioso de la expresión del *myt1c* en este tejido por medio del uso del par de *primers* de hepatopáncreas.

Además de las funciones descritas, Balseiro y colaboradores han determinado que el Myt1c no sólo tiene un papel en la actividad antimicrobiana, sino que también puede actuar como un modulador, al activar la expresión genes que codifican para moléculas efectoras, como el Myt1b, cuyo patrón de expresión ya ha sido estudiado en este mismo laboratorio, con resultados de expresión significativa en hemolinfa tras la exposición al OA (Flórez-Barrós, 2012). La sobreexpresión de este gen en el presente trabajo está en concordancia con los resultados obtenidos en estudios anteriores y con el efecto que el OA tiene sobre el sistema inmune al inducir la expresión de genes relacionados con el mismo ante la presencia de un compuesto extraño como esta toxina.

El gen *hemolectin*, sobreexpresado significativamente en branquia, codifica para la Hemolectina, una proteína que forma parte de la familia de lectinas tipo C, un grupo de moléculas receptoras, presente en la mayor parte de los invertebrados, caracterizadas por poseer un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD), y que participa en la defensa contra las infecciones microbianas y cuerpos extraños debido a su capacidad para reconocer y unirse a los azúcares terminales presentes en las glucoproteínas y glucolípidos de la superficie de las bacterias y sustancias exógenas. Tras este reconocimiento y unión, las lectinas actúan como opsoninas, participando en la eliminación de las bacterias y cuerpos extraños al facilitar la fagocitosis de las mismas. En bivalvos, las lectinas tipo C han sido identificadas principalmente en la hemolinfa y en los hemocitos, a pesar de que también pueden estar presentes en otros tejidos (Chatterjee & Adhya, 2013). A pesar del conocimiento que se tiene sobre las lectinas tipo C en moluscos bivalvos, la Hemolectin no ha sido demasiado estudiada en este grupo de organismos, encontrándose la mayor parte de la información de esta molécula en *Drosophila*, donde parece actuar como un factor de coagulación de la hemolinfa en larvas y como elemento de actividad antimicrobiana en los individuos adultos (Lesch *et al.*, 2007). Esta proteína de 400kDa es secretada por los hemocitos de las larvas y se caracteriza por poseer dominios conservados similares a los presentes en el factor de von Willebrand de humanos, una glucoproteína de la sangre que interviene en el momento inicial de la hemostasia, al permitir que las plaquetas se unan de manera estable a la superficie del vaso roto. (Goto *et al.*, 2001). La sobreexpresión significativa de este gen en la branquia, puede deberse a una posible contaminación por hemolinfa del tejido empleado en este estudio, ya que en el momento de la disección y obtención de las branquias de los individuos, estas no fueron lavadas, pudiendo contener restos de este fluido (la presencia de un sistema circulatorio abierto, hace que la contaminación por fluidos circulatorios sea más sencilla). La posible existencia de hemolinfa en las branquias, implicaría también la presencia de hemocitos en las mismas, los cuales producirían la Hemolectin al entrar en contacto con el OA, con el fin de eliminarlo. Otra posible explicación de esta sobreexpresión significativa de la Hemolectin en la branquia, es que este órgano también sea capaz de producir esta molécula. Además, debido a su posible implicación en el proceso de opsonización, la sobreexpresión de la Hemolectin, parece estar en consonancia con otros estudios realizados en hemocitos de mejillón, en los que se observó un incremento de la actividad fagocítica tras la exposición al OA (Malagoli *et al.*, 2008).

Por otra parte, la sobreexpresión significativa de las regiones génicas *unigen1* y *unigen2* en branquia, hace que estas puedan ser posibles biomarcadores de contaminación temprana al OA. Sin embargo, debido al gran desconocimiento que se tiene sobre el genoma del mejillón, estas

secuencias no han podido ser anotadas, con lo que su función no es conocida hasta el momento, requiriéndose un estudio más exhaustivo para determinar su implicación en el organismo y sus posibles utilidades como biomarcador. El gran número de secuencias no anotadas y de función desconocida presentes en trabajos de expresión diferencial, como el de Manfrin y colaboradores (2010), en el que más de la mitad de los transcritos sobreexpresados significativamente carecen de función conocida, pone de manifiesto la necesidad de secuenciación del genoma del mejillón, con el fin de obtener biomarcadores de contaminación temprana y comprender de una forma más clara los efectos del OA sobre los moluscos bivalvos.

En este trabajo se ha analizado la expresión diferencial de genes relacionados con la inmunidad, con lo que para obtener una mayor información de los mismos, debería procederse a su estudio en la hemolinfa, un tejido más relacionado con la respuesta inmune que la branquia y el hepatopáncreas., a pesar de la “dificultad” de trabajar con este tejido debido a que en algunas épocas del año este puede estar contaminado con el esperma de la gónada. También podría ser interesante el estudio de la expresión de estos mismos genes a otras concentraciones de toxina y a tiempos de exposición más largos, con el fin de obtener una información más completa sobre su patrón de expresión. En cuanto a las regiones génicas estudiadas (*unigen1* y *unigen2*), podría ser de interés su caracterización por medio de una PCR-RACE ya que podrían ser empleadas como biomarcadores de contaminación temprana, en programas de biomonitorización ambiental.

CONCLUSIONES

En el mejillón *M. galloprovincialis* sometido a la acción del OA, la branquia y el hepatopáncreas presentaron patrones de expresión génica diferentes debido a las características funcionales de ambos tejidos.

En branquia:

Las regiones génicas *unigen1* y *unigen2* y el gen *hemolectin*, mostraron un patrón de sobreexpresión significativo en mejillones expuestos a concentraciones bajas de OA. Mientras que los genes *ferritin* y *myticin c* no presentaron un patrón de sobreexpresión significativa.

En hepatopáncreas:

El gen *myticin c* mostró un patrón de sobreexpresión significativo. Las regiones génicas *unigen1*, *unigen2* y los genes *ferritin* y *hemolectin* no presentaron un patrón de sobreexpresión significativo.

Las regiones génicas *unigen1* y *unigen2* y el gen *hemolectin* podrían ser empleados como posibles biomarcadores de contaminación temprana por OA en branquia, mientras que el gen *myticin c*, podría ser un posible biomarcador en hepatopáncreas.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, D.M. & Garrison, D.J. (1997). The ecology and oceanography of harmful algal blooms. *Limnology and Oceanography*, 42: 1009-1305.
- Balseiro, P., Falcó, A., Romero, A., Dios, S., Martínez-López, A., Figueras, A., Estepa, A. & Novoa, B. (2011). *Mytilus galloprovincialis* Myticin C: A Chemotactic Molecule with Antiviral Activity and Immunoregulatory Properties. *PLoS ONE*, 6: e23140.
- Blanco, J., Moroño, A. & Fernández, M.L. (2005). Toxic episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: An overview. *Revista Galega dos Recursos Mariños*, 1: 1-70.
- Blanco, J., Mariño, C., Martín, H. & Acosta, C.P. (2007). Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, 50: 1011-1018.
- Chatterjee, B.P. & Adhya, M. (2013). Lectins with Varying Specificity and Biological Activity from Marine Bivalves. En Se-Kwom, K. *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*, 41-69.
- Consejo Regulador de la Denominación de Origen del Mejillón en Galicia. (2012). Recuperado el 7 de junio de 2014 de http://www.mexillondeg Galicia.org/denominacion_de_orixe_protexida/sector.php.
- Craft, J.A., Gilbert, J.A., Temperton, B., Dempsey, K.E., Ashelford, K., Tiwari, B., Hutchinson, T.H. & Chipman, J.K. (2010). Pyrosequencing of *Mytilus galloprovincialis* cDNAs: Tissue-specific expression patterns. *PLoS ONE*, 5: e8875.
- Crathorne, B., Dobbs, A.J. & Rees, Y. (1996). Chemical pollution of the aquatic environment by priority pollutants and its control. En Harrison, R.M. *Pollution: Causes, Effects and Control*, 1-25.
- Daranas, A.H., Norte, M. & Fernández, J.J. (2001). Toxin marine microalgae. *Toxicon*, 39:1101-1132.
- De Zoysa, M. (2013). Antimicrobial Peptides in Marine Mollusks and their Potential Applications. En Se-Kwom, K. *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*, 695-709.
- Domínguez, H.J., Paz, B., Daranas, A.H., Norte, M., Franco, J.M. & Fernández, J.J. (2010). Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: Characterization, analysis and human health implications. *Toxicon*, 56: 191-217.
- Farrington, J.W., Davis, A.C., Tripp, B.W., Phelps, D.K. & Galloway, W.B. (1987). Mussel Watch-Measurements of chemical pollutants in bivalves as an indicator of coastal environmental quality. En Boyle, T.P. *New approaches to monitoring aquatic ecosystems*, 125-139.
- Fernández-Tajes, J., Laffon, B. y Méndez, J. (2010). The use of biomarkers in bivalve molluscs for the evaluation of marine environment pollution. En Ahmed el Nemr. *Impact, Monitoring and Management of Environmental Pollution*, 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., van den Top, H. J. & de Boer, J. (2010). Marine toxins: Chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation. *Toxins*, 2: 878-904.
- Goldberg, E.D. (1975). The mussel watch: a first step in global monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, 6, 111.
- Goto, A., Kumagai, T., Kumagai, C., Hirose, J., Narita, H., Mori, H., Kadowaki, T., Beck, K. & Kitagawa, Y. (2001). A *Drosophila* haemocyte-specific protein, hemolectin, similar to human von Willebrand factor. *Biochemistry Journal*, 359: 99-108.

- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6:986-994.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11: 1026-30.
- Jamil, K. (2001). *Bioindicators and biomarkers of environmental pollution and risk assessment*. Ed. Sci Pun Inc.
- Kennish, M.J. (1996). *Practical handbook of estuarine and marine pollution*. Ed. CRC Press.
- Kong, P., Wang, L., Zhang, H., Zhou, Z., Qiu, L., Gai, Y. & Song, L. (2010). Two novel secreted ferritins involved in immune defense of Chinese mitten crab *Ericher sinensis*. *Fish Shellfish Immunology*, 28: 604-612.
- Lesch, C., Goto, A., Lindgren, M., Bidla, G., Dushay, M.S & Theopold, U. (2007). A role for Hemolectin in coagulation and immunity in *Drosophila melanogaster*. *Developmental & Comparative Immunology*, 31: 1255-1263.
- Lettieri T. (2006). Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, 114: 4-9.
- Li, J., Li, L., Zhang, S., Li, J. & Zhang, G. (2012). Three ferritin subunits involved in immune defense from bay scallop *Argopecten irradians*. *Fish Shellfish Immunology*, 32: 368-372.
- 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.
- Malagoli, D., Casarini, L. & Ottaviani, E. (2008). Effects of the marine toxins okadaic acid and palytoxin on mussel phagocytosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 24: 180-186.
- Manfrin, C., Dreos, R., Battistella, S., Beran, A., Gerdol, M., Varotto, L., Lanfranchi, G., Venier, P. & Pallavicini, A. (2010). Mediterranean mussel gene expression profile induced by okadaic acid exposure. *Environmental Science & Technology*, 44: 8276-8283.
- Martínez-Escauriza, R. (2013). Identificación de Genes Implicados en la Eliminación de Biotoxinas en el Mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: Clonación y Expresión de los cDNA que Codifican para dos Proteínas Transportadoras ABC de la Subfamilia B (Proteínas MDR). Tesis doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.
- Munday, R. (2013). Is the proteína phosphatase inhibition responsable fot the toxic effects of okadaic acid in animals? *Toxins*, 5:267-285.
- Murakami, Y., Oshima, Y. & Yasumoto, T. (1982). Identification of okadaic acid as a toxiccomponent of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 48: 69-72.
- Pettersson, L.H. & Pozdnyakov, D. (2013). *Monitoring of harmful algal blooms*. Ed. Springer.
- Pfaffl, M.W. (2006). Relative quantification. En Dorak, M.T. *Real-time PCR*, 63-82.
- Ponchel, F. (2006). Real.time PCR using SYBR Green. En Dorak, M.T. *Real-time PCR*, 139-154.
- Prego-Faraldo, M. V., Valdíglesias, 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: 2829-2845.

- Reece, R.J. (2004). *Analysis of genes and genomes*. Ed. John Wiley & Sons, Ltd.
- Reguera, B., Velo-Suárez, L., Raine, R. & Park, M. (2012). Harmful *Dinophysis* species: A review. *Harmful Algae*, 14: 87–106.
- Reguera, B., Riobó, P., Rodríguez, F., Díaz, P. A., Pizarro, G., & Paz, B. (2014). Dinophysis toxins: Causative organisms, distribution and fate in shellfish. *Marine Drugs*, 12: 394-461.
- Regulation EC, 10 January 2002. No 15/2011. Methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs. *Official Journal of the European Union*, 6/3-6/6.
- Regulation EC, 5 December 2005. No 2074/2005 of the European parliament and of the council of 22 December 2005 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Union*, 338:27-205.
- Riobó, P., Reguera, B., Franco, J.M. & Rodríguez, F. (2013). First report of the toxin profile of *Dinophysis sacculus* Stein from LC-MS analysis of laboratory cultures. *Toxicon*, 76: 221–224.
- Rodríguez-Lázaro, D. & Hernández, M. (2013). Introduction to the Real-time Polymerase Chain Reaction. En Rodríguez-Lázaro, D. *Real-time PCR in Food Science: Current Technology and Applications*, 3-19.
- Saavedra, C. & Bachère, E. (2006). Bivalve genomics. *Aquaculture*, 256: 1-14.
- Schettino, T., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M.E. & Lionetto, M.G. (2012). Biomarker Approach in Marine Monitoring and Assessment: New Insights and Perspectives. *Open Environmental Sciences*, 6: 20-27.
- Shipley, G.L. (2006). An introduction to real-time PCR. En Dorak, M.T. *Real-time PCR*, 1-38.
- Suárez-Ulloa, V., Fernandez-Tajes, J., Aguiar-Pulido, V., Rivera-Casas, C., Gonzalez-Romero, R., Ausio, J., Mendez, J., Dorado, 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: 830–841.
- Suárez-Ulloa, V., Fernandez-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: 4370-4389.
- Tachibana, K., Scheuer, P., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Enden, V., Clardy, J., Gopichand, Y. & Schmitz, F. (1981). Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *Journals-American Chemical Society*, 103: 2469–2471.
- 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., Lapègue, S., Leite, R., Moal, J., Moraga, D., Reinhardt, R., Samain, J., Zouros, E. & 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.
- Valdiglesias, V., Prego-Faraldo, M. V., Pasaro, E., Méndez, J., & Laffon, B. (2013). Okadaic acid: More than a diarrhetic toxin. *Marine Drugs*, 11: 4328-4349.
- Van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish Bioaccumulation and Biomarkers in Environmental Risk Assessment: A Review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13:57-149.
- Varotto, L., Domeneghetti, S., Rosani, U., Manfrin, C., Cajaraville, M.P., Raccanelli, S., Pallavicini, A. &

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. & Lanfranchi, G. (2003). Towards a catalogue of genes transcribed in multiple tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Gene*, 314: 29-40.

Venier, P., de Pitta, C., Pallavicini, A., Marsano, F., Varotto, L., Romualdi, C., Dondero, F., Viarengo, A. & Lanfranchi, G. (2006). Development of mussel mRNA profiling: Can gene expression trends reveal coastal water pollution? *Mutation Research*, 602: 121-134.

Venier, P., de Pitta, C., Bernante, F., Varotto, L., de Nardi, B., Bovo, G., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A. & Pallavicini, A. (2009). MytiBase: A knowledgebase of mussel (*M. galloprovincialis*) transcribed sequences. *BMC Genomics*, 10: 72.

Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X. & Qi, H. (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature*, 490, 49-54.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias al proyecto Evaluación citogenética y molecular de la respuesta temprana del mejillón *Mytilus galloprovincialis* al ácido okadaico (AO). AGL2012-308977 del Ministerio de Economía y Competitividad.

Además quiero expresar mi gratitud a Verónica Faraldo Prego por su inestimable ayuda.