



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

ÁREA DE GENÉTICA

EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO Y MUERTE CELULAR EN CÉLULAS DE MEJILLÓN EXPUESTAS A ÁCIDO OKADAICO

MÁSTER EN BIOLOGÍA CELULAR MOLECULAR Y GENÉTICA
(2013-2014)

Trabajo de Fin de Máster presentado por

Clara Hidalgo Gómez

Julio 2014



La Dra. **Josefina Méndez Felpeto**, Catedrática de Universidad y coordinadora del grupo XENOMAR, la Dra. **Vanessa Valdiglesias García**, Investigadora en la Unidad de Toxicología de la Universidade da Coruña.

INFORMAN:

Que el presente Trabajo Fin de Máster titulado “**EVALUACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO Y MUERTE CELULAR EN CÉLULAS DE MEJILLÓN EXPUESTAS A ÁCIDO OKADAICO**” presentado por Dña. Clara Hidalgo Gómez, ha sido elaborado bajo nuestra supervisión y, considerándolo finalizado, damos nuestro visto bueno para su presentación y defensa ante el tribunal calificador.

A Coruña, 18 de Julio de 2014

Fdo.: Josefina Méndez Felpeto

Fdo.: Vanessa Valdiglesias García

AGRADECIMIENTOS:

A Don Francisco José Rodríguez López, por su ayuda, predisposición e interés. Por proporcionarme al fin y al cabo, la “semilla” de este trabajo.

A mis tutoras, por su apoyo, su orientación y por dejarme formar parte de la familia de XENOMAR.

A Verónica, por su tiempo, su dedicación, su paciencia y por todo lo que he aprendido de ella.

“No perdamos nada de nuestro tiempo; quizá los hubo más bellos,
pero este es el nuestro.”

Jean Paul Sartre
(1905-1980)

ÍNDICE

Introducción.....	1
1. Las floraciones de algas nocivas y las toxinas marinas.....	1
2. Toxinas DSP: el ácido okadaico.....	2
3. Ensayos para la evaluación del daño citogenético producido por AO.....	3
4. El mejillón como organismo centinela.....	8
Objetivos	10
Material y Métodos	11
1. Material objeto de estudio	11
2. Determinación de la concentración de AO en el tejido de los mejillones.....	12
3. Preparación de las suspensiones celulares.....	12
4. Incubaciones con AO.....	13
5. Estudio de la muerte celular por citometría de flujo	13
6. Ensayo del cometa.....	14
7. Análisis estadístico de los datos	16
Resultados	17
1. Evaluación de la muerte celular por citometría de flujo.....	17
2. Evaluación de la genotoxicidad por ensayo del cometa.....	19
Discusión.....	23
Conclusiones	28
Referencias bibliográficas.....	29

Introducción

1. Las floraciones algales nocivas y las toxinas marinas

Las Floraciones Algales Nocivas (FANs) constituyen una de las fuentes más importantes de contaminación natural en el medio marino. Son producidas por la proliferación masiva de fitoplancton y su acumulación en un área determinada (Figura 1). Se han descrito unas 5.000 especies de microalgas marinas en todo el mundo, y aunque sólo se ha demostrado que un 2% son peligrosas o tóxicas, este porcentaje parece estar en aumento, lo cual se atribuye a la reciente inclusión de las microalgas bentónicas y especies nocivas no fotosintéticas que habitualmente no "florecen", y a la inclusión de especies descritas previamente como benignas, que ahora se catalogan como perjudiciales (Landsberg, 2002).



FIGURA 1.- Aspecto de la playa de Silgar (Sanxenxo, Pontevedra) cuyas aguas aparecieron teñidas por el fitoplancton en 2001. (http://www.lavozdeg Galicia.es/santiago/2011/12/14/0003_201112SE14P7991.htm)

Estos fenómenos naturales pueden conllevar a la aparición de altas concentraciones de toxinas potencialmente dañinas que se acumulan a través de la cadena trófica. Además, ciertas especies productoras de toxinas, tales como las especies de los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum*, originan episodios de contaminación significativos incluso a densidades de población de sólo varios cientos de células por litro (Sellner, 2003).

Los principales grupos de toxinas marinas se pueden clasificar de acuerdo con las enfermedades que producen, entre las que se incluyen las intoxicaciones paralizantes (PSP - *Paralytic Shellfish Poisons*-), intoxicaciones neurotóxicas (NSP -*Neurotoxic Shellfish Poisons*-), intoxicaciones amnésicas (ASP -*Amnesic Shellfish Poisons*-) e intoxicaciones

diarreicas (DSP -*Diarrhetic Shellfish Poisons*-), entre otras (Daranas *et al.*, 2001; Gerssen *et al.*, 2010).

2. Toxinas DSP: el ácido okadaico

El síndrome DSP es una enfermedad causada por las toxinas del grupo del ácido okadaico (AO), incluyendo el AO y sus análogos, como dinophysistoxin-1 (DTX1), dinophysistoxin-2 (DTX2) y sus derivados de acilo, generalmente conocidos como dinophysistoxin-3 (DTX3). El OA constituye un metabolito secundario de tipo poliéter, aislado por primera vez de la esponja marina *Halichondria okadai* (Tachibana *et al.*, 1981) y por lo general producido por dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum* (Lee *et al.*, 1989; Regeira *et al.*, 2012; Yasumoto *et al.*, 1980).

Dado su carácter lipofílico, las toxinas AO se acumulan fácilmente en los tejidos grasos de organismos filtradores marinos, extendiéndose rápidamente a sus depredadores en la cadena trófica y, llegando finalmente a los consumidores humanos (Figura 2). Los efectos negativos del AO junto con las pérdidas económicas asociadas a episodios FANs, han motivado numerosos estudios destinados a evaluar los efectos de esta toxina a nivel celular y molecular.

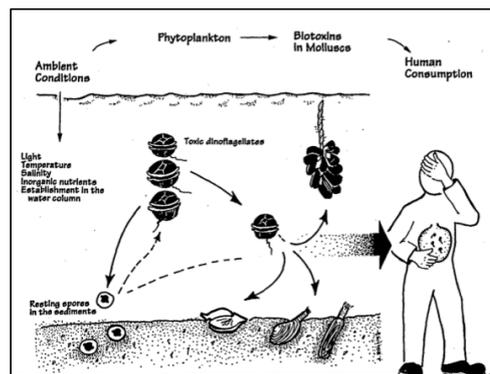


FIGURA 2.- Esquema del recorrido del AO a través de la cadena trófica (Shumway, 1995).

La toxicidad del AO se ha atribuido principalmente a su función como inhibidor específico de las proteínas fosfatasa PP1 y PP2A, que están implicadas en la regulación de múltiples procesos celulares mediante la modulación del grado de fosforilación o desfosforilación de las proteínas, por lo que su inhibición da lugar a alteraciones celulares importantes (Daranas *et al.*, 2001).

La fosfatasa PP1 está implicada en la regulación del metabolismo del glucógeno, en la división celular, síntesis proteica y contracción del músculo liso; mientras que la fosfatasa PP2 participa en el control de la mayoría de rutas metabólicas como la glucólisis, el metabolismo de lípidos, la apoptosis, el crecimiento y división celular, la transcripción y la síntesis de proteínas. El amplio espectro de mecanismos en los que dichas proteínas participan refleja la importancia de su correcto funcionamiento y, por tanto, de los efectos adversos que puede llegar a causar el AO sobre los organismos (Fernández *et al.*, 2002). Hasta el momento, los esfuerzos en investigación se han centrado principalmente en evaluar la alteración de estos mecanismos mediante el empleo de líneas celulares de mamíferos como sistemas modelo, revelando la capacidad del AO para promover tumores e inducir apoptosis (Prego-Faraldo *et al.*, 2013).

Sin embargo, la evaluación de estos efectos en moluscos bivalvos adquiere una relevancia especial debido a que constituyen la principal diana de acumulación del AO en el medio marino. En estos organismos el AO se absorbe y se acumula principalmente en la glándula digestiva, tanto de forma libre como asociado, en su mayor parte a lipoproteínas solubles de alta densidad. Esta asociación da como resultado el “secuestro” del AO, previniendo su transporte a otros tejidos y dificultando su eliminación del organismo. Por el contrario, el AO libre se transporta fácilmente y se retira rápidamente por medio de diferentes mecanismos de detoxificación pasivos, tales como la excreción de AO directa a través de la branquia o el sistema digestivo (Shumway, 1995; Prego-Faraldo *et al.*, 2013).

3. Ensayos para la evaluación del daño citogenético producido por AO

Los efectos genotóxicos y citotóxicos del AO en organismos marinos, y especialmente en moluscos bivalvos, se ha mantenido en un segundo plano respecto a la atención prestada a los

estudios en células de mamíferos. Sin embargo, recientemente el número de experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* se han visto incrementados con la finalidad de obtener posibles biomarcadores de contaminación (Prego-Faraldo *et al.*, 2013). La Figura 3 recoge los principales efectos citotóxicos que puede causar el AO y las diferentes metodologías para su detección.

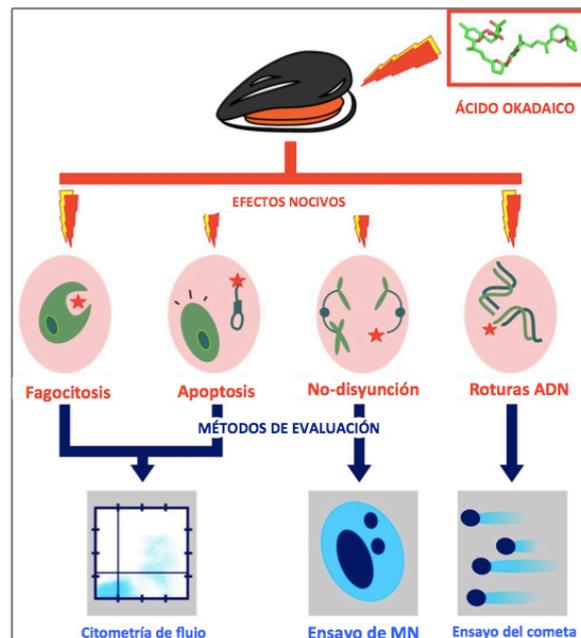


FIGURA 3.- Principales efectos genotóxicos y citotóxicos causados por el AO en moluscos bivalvos y los métodos de evaluación utilizados (Prego-Faraldo *et al.*, 2013).

3.1. Ensayos de citotoxicidad: evaluación de muerte celular

Cuando una célula está expuesta a un determinado agente tóxico éste puede inducir su muerte a través de distintos mecanismos, pero también puede ocurrir que alguna estructura celular resulte dañada o alterada como consecuencia del contacto con este tóxico. Si la célula no es capaz de reparar este daño entrará igualmente en un proceso de apoptosis y morirá. Actualmente se conocen distintos tipos de muerte celular que han sido definidos y

clasificados, fundamentalmente en base a criterios morfológicos (Duprez *et al.*, 2009). Los dos tipos de muerte celular más comunes y conocidos son la apoptosis y la necrosis. La muerte celular programada o apoptosis es un proceso ordenado que puede activarse por diferentes estímulos apoptóticos y que está regulado por numerosos factores a través de distintas vías apoptóticas (Xing *et al.*, 2008). Por otro lado, la necrosis está considerada como un proceso tóxico en el que la célula es una víctima pasiva y sigue un modo de muerte independiente de energía (Elmore, 2007).

Para el estudio de los niveles de apoptosis y necrosis inducidos por AO, una de las metodologías más empleadas es la doble tinción con anexina V-PE (marcada con ficoeritrina) y 7-AAD (7-Aminoactinomicina D) evaluada por medio de citometría de flujo. Esta técnica permite realizar una clara distinción entre apoptosis y necrosis de una manera rápida y eficaz. La anexina es una proteína que presenta afinidad específica por la fosfatidilserina, localizada en la cara interna de la membrana plasmática. Uno de los primeros cambios fisiológicos que las células en apoptosis experimentan es la redistribución de la fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana plasmática hacia la cara externa. El 7-AAD es un componente químico fluorescente con una fuerte afinidad por el ADN pero que no es capaz de atravesar las membranas celulares, éstas deben ser permeabilizadas o disgregadas para posibilitar la unión del 7-AAD con el ADN. El empleo simultáneo de estos dos marcadores permite el análisis de los niveles de apoptosis y necrosis ya que, la anexina V-PE se unirá a las células en etapas tempranas de apoptosis, y el 7-AAD no será captado porque es incapaz de atravesar las membranas celulares; mientras que en etapas tardías de apoptosis o en procesos de necrosis, tanto la anexina como el 7-AAD se unirán a las células. (Schmid *et al.*, 1992). En la Figura 4 se visualiza una adquisición de una de las muestras analizadas mediante citometría de flujo utilizando dicha técnica.

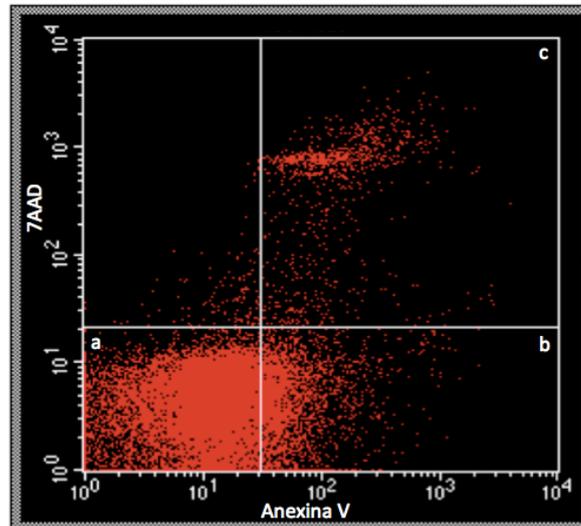


FIGURA 4.- Diagrama de puntos mostrando las regiones de células vivas (a), en apoptosis temprana (b) y en necrosis (c).

3.2. Ensayos de genotoxicidad: el ensayo del cometa

Los ensayos de genotoxicidad se utilizan para evaluar los daños producidos en el material genético asociados a la exposición de determinados agentes y existen diversas metodologías, siendo una de las más utilizadas la electroforesis en gel de células individuales (SCGE, *Single Cell Gel Electrophoresis*), también denominada el ensayo del cometa.

El principio básico del ensayo del cometa es la migración del material genético en una matriz de agarosa tras una electroforesis, de forma que, cuando hay roturas en el ADN los fragmentos resultantes migran por la acción del campo eléctrico (Hartman *et al.*, 2003). Una incubación en una solución de lisis permite la eliminación de todo el contenido celular, a excepción del material nuclear. Cuando las preparaciones son observadas al microscopio las células dañadas tienen apariencia de cometa, formadas por una cabeza (región nuclear) y una cola que contiene los fragmentos de ADN que han migrado en dirección al ánodo, mientras que en las células sin dañar no se forma la cola, conservando una forma esférica (Figura 5).

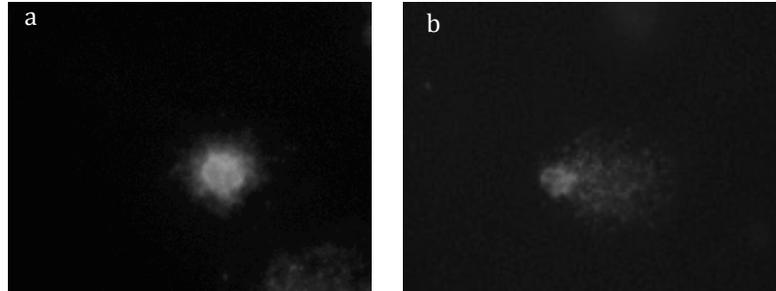


FIGURA 5.- Células de hemolinfa de mejillón observadas al microscopio de fluorescencia tras la realización del ensayo del cometa; a: célula no dañada (control), b: célula dañada.

La técnica original se basa en el comportamiento del ADN de células individuales bajo un campo eléctrico, detectando roturas inducidas por radiación ionizante (Östling y Johanson, 1984). Estos autores emplearon un pH de 10 (por debajo del requerido para el desenrollamiento del ADN). Posteriormente, se incluyeron variaciones en el método utilizando condiciones alcalinas en la electroforesis ($\text{pH} > 13$), de forma que se facilita la desnaturalización y desenrollamiento del material genético, haciendo evidentes las roturas de cadena sencilla y generando roturas a partir de los sitios álcali-lábiles (Singh *et al.*, 1988).

El ensayo del cometa presenta una serie de ventajas que hace que sea una herramienta idónea para estudios de genotoxicidad, puesto que para su realización no se requieren cantidades muy elevadas de células, es decir, se requiere poco material de partida, el cual puede ser sencillamente obtenido y además de bajo coste; es un proceso que no origina residuos altamente contaminantes (al contrario que otras técnicas como son las radiactivas); el procedimiento completo puede realizarse en unas horas, y los resultados pueden ser evaluados en cortos periodos de tiempo; además de que es un método muy sensible para la detección de daño en el material genético, permite también analizar la persistencia de los efectos y es posible aplicarlo a todo tipo de células eucariotas adaptando la metodología a las condiciones óptimas de cada tipo celular (Rábade, 2010).

4. El mejillón como organismo centinela

Moluscos bivalvos como el mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) presentan una serie de cualidades que los hacen idóneos para su uso como bioindicadores de contaminación. Por un lado, son organismos sésiles y filtradores que acumulan en sus tejidos los compuestos en suspensión presentes en la columna de agua, compuestos que además eliminan muy lentamente debido a su baja tasa metabólica. Por otro lado, presentan una amplísima distribución geográfica, lo que facilita los estudios de campo y su muestreo, y además, son organismos con una elevada tasa de supervivencia en condiciones de laboratorio, lo que les convierte en candidatos perfectos para la realización de estudios *in vivo* e *in vitro*. Desde el programa *Mussel Watch* (Golberg, 1975), los moluscos bivalvos son empleados como organismos bioindicadores para la biomonitorización de la contaminación marina (Fisher *et al.*, 1996; Adamo *et al.*, 1997; Frenzilli *et al.*, 2000).

Además y debido a que las toxinas DSP son las biotoxinas marinas más abundantes en Europa y, concretamente, en la costa gallega, resulta imprescindible la caracterización del efecto que ejerce el AO sobre los moluscos bivalvos, ya que estos organismos constituyen las dianas de dichas toxinas, donde se acumulan, convirtiéndose en el vector a través del cual llegan por ingesta al consumidor.

El mejillón, considerado como un buen organismo de experimentación, es también un importante recurso alimenticio en localidades costeras, como Galicia, donde la industria marisquera supone un pilar económico fundamental y en el que cada año se hacen más evidentes las pérdidas, tanto por contaminaciones puntuales, la más reciente en 2002, caso *Prestige*, como por las cada vez más frecuentes floraciones algales nocivas, que impiden la extracción y venta de este tipo de marisco. La presencia de la toxina genera notables pérdidas económicas en el sector. Actualmente, la legislación permite una cantidad de toxina de 160 µg/kg de vianda, por lo que los moluscos con cantidades inferiores son introducidos en el mercado y finalmente llegan al consumidor, haciendo imprescindible para el futuro el desarrollo de nuevos análisis de mayor potencial que permitan aumentar al máximo la seguridad alimentaria.

Aparte de su idoneidad como organismo centinela y de su interés comercial, estos organismos, entre otros moluscos bivalvos, son los más interesantes de cara a estudiar los efectos del AO, debido a la sorprendente resistencia que parecen presentar ante esta toxina, a diferencia de la susceptibilidad detectada en distintos tipos celulares de otros organismos (Tubaro *et al.*, 1996; Fladmark *et al.*, 1998; Tohda *et al.*, 1994). Se ha intentado estudiar la base de esa tolerancia a través de diferentes experimentos, mediante el análisis del efecto de diferentes concentraciones de AO en las células de mejillón, revelando un aumento de la resistencia ante concentraciones subletales de esta toxina como resultado de la resistencia multixenobiótica (Svensson, 2003). Estos informes concluyen que la exposición frecuente al AO en el medio marino podría explicar la alta tolerancia observada en los moluscos bivalvos. Además, se ha propuesto que tal resistencia puede incrementarse aún más mediante el secuestro de la OA en el compartimento lisosomal, protegiendo las células de los efectos citotóxicos de estas biotoxinas (Prego-Faraldo *et al.*, 2013).

El presente trabajo pretende evaluar los posibles efectos citogenéticos causados por AO en mejillón dentro de un proyecto de investigación llevado a cabo por el grupo XENOMAR de la Universidade da Coruña cuyo objetivo consiste en la evaluación de los efectos inducidos por el AO a concentraciones bajas y tiempos de exposición cortos, así como la validación de ensayos citogenéticos como herramientas de biomonitorización con el objetivo de desarrollar biomarcadores que permitan la detección temprana del AO en el medio marino.

Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo general la evaluación *in vitro* de los efectos citogenéticos ejercidos por el Ácido Okadaico (AO) en diferentes tejidos del mejillón *Mytilus galloprovincialis* empleando bajas concentraciones (10, 50, 100, 200 y 500 nM) y periodos de exposición cortos (1 y 2 horas). Para este objetivo general, nos hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluación del daño citotóxico causado por el AO en células de hemolinfa de mejillón mediante citometría de flujo.
2. Evaluación del daño genotóxico causado por el AO en células de hemolinfa y branquia de mejillón mediante ensayo del cometa.

Material y Métodos

1. Material objeto de estudio.

Las muestras de hemolinfa y branquia utilizadas en este trabajo fueron obtenidas a partir de ejemplares de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), cedidos al grupo de investigación por Don Francisco José Rodríguez López, responsable de la empresa Mexilor S.L. y recogidos en la batea *Elvira 6* del puerto de Lorbé, situada en el polígono de Sada 1 en la ría de Ares-Betanzos (Figura 6).

Tras su recolección, los ejemplares fueron transportados al laboratorio, se introdujeron en tanques de 20 litros y se mantuvieron en un circuito semiabierto durante 2 días en condiciones naturales de fotoperíodo y a temperatura controlada (18°C) con oxigenación (>90%) constante. Para cada experimento se utilizaron individuos que habían permanecido 48 horas en aclimatación. Durante este tiempo, los mejillones fueron alimentados con algas de las especies *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suecica*.



FIGURA 6-. Ubicación de la batea del puerto de Lorbé, en la Ría de Ares-Betanzos, donde fueron extraídos los individuos utilizados para todos los experimentos. Modificada de <http://sig.intecmar.org/EstadoZonas/Default.aspx?sm=a1>

2. Determinación de la concentración de AO en el tejido de los mejillones

Los análisis del contenido de AO se llevaron a cabo en la Unidad Cromatográfica de los Servicios de Apoyo a la Investigación (S.A.I.) de la Universidade da Coruña, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectroscopía de masas de alta resolución (HPLC/MS), siguiendo el protocolo establecido por la Unión Europea en el “European Union (UE) harmonized Standard Operating Procedure for determination of OA-groups toxins”, descrito por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea de Biotoxinas Marinas(http://aesan.msssi.gob.es/CRLMB/web/laboratorio_nacional_referencia/laboratorio_nacional_referencia.shtml).

Este método se basa en la extracción con metanol del AO libre presente en una muestra de tejido liofilizado y homogenizado. Los extractos se filtran y se analizan directamente mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de espectrometría de masa tándem (LC-MS/MS) operando en modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*).

3. Preparación de las suspensiones celulares

Para la obtención de hemolinfa se practicó en cada individuo una incisión con un esmeril en la concha del mejillón, en la superficie de unión de ambas valvas y en un lateral, próximo al músculo abductor. Con una jeringuilla de 1 mL, primero se tomaron unos 300 µL de Alserver (Glucosa 15 mM, Na₃C₆H₅O₇ 27 mM, NaCl 328 mM, EDTA 11,5 mM, pH=7,5), luego se extrajo la hemolinfa (1mL aproximadamente) y se pasó a tubos Eppendorf, usando uno para cada individuo, y manteniendo las muestras en hielo.

Las muestras obtenidas se analizaron al microscopio y para seleccionar las que presentaban mayor número de células, menor cantidad de esperma y menor grado de aglutinación. Una vez determinada la calidad de la hemolinfa, se realizó un *pool* de las muestras seleccionadas y se filtró usando una malla de 55 µm de diámetro. Tras el filtrado se analizó la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión del colorante vital Trypan Blue (0.4%, SIGMA), resultando en todos los casos superior al 80%, y posteriormente se procedió al recuento de células por mililitro con una cámara Thoma.

Las células de branquia se obtuvieron siguiendo el método propuesto por Pérez-Cadahía *et al.*, (2004), diseccionando el tejido branquial tras tres lavados de 1 minuto cada uno en 2 mL de CMFS (NaCl 500 mM, KCl 12,5 mM, EDTA 5 mM, Hepes 20 mM, en medio RPMI) frío, con ayuda de pinzas y tijeras de disección. Una vez disgregado, se pasó el contenido a tubos Falcon de 15 mL y se añadieron 6 mL de CMFS. Posteriormente, manteniendo los tubos en hielo y en oscuridad, se procedió a una agitación horizontal suave durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, y sin retirarlos del hielo, se eligieron las muestras con mayor número de células, para hacer un *pool* de individuos. Posteriormente se filtró el contenido de los tubos a través de una malla de 55 μ m de diámetro y con ayuda de una jeringa. Se evaluó la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión del colorante vital Tripán Blue (0,4%, SIGMA), resultando en todos los casos superior al 80%. Posteriormente, se pasó el contenido filtrado a tubos Eppendorf nuevos, para centrifugarlos a 500 xg durante 5 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de *Kenny's Salt Solution* (NaCl 200 mM, KCl 9 mM, K₂HPO₄ 0,7 mM, NaHCO₃ 2 mM).

4. Incubaciones con AO

Las muestras de branquia y hemolinfa se sometieron a la acción del AO a las mismas concentraciones y durante el mismo tiempo. En ambos casos, del *pool* original se separaron tres muestras, dos para ser usadas como control negativo, una como control positivo (incubada con H₂O₂ 100 μ M, 5 minutos) y el resto se sometieron a concentraciones de AO de 10, 50, 100, 200 y 500 μ M con tiempos de incubación de 1 y 2 horas.

Posteriormente, estas muestras fueron empleadas para el desarrollo de los ensayos propuestos en este trabajo, siendo cada uno de ellos realizado por triplicado.

5. Estudio de la muerte celular por citometría de flujo

Para evaluar los niveles de apoptosis y necrosis inducidos por el AO en las células de hemolinfa se utilizó la tinción con anexina V-PE y 7-AAD, debido a la afinidad de la anexina por la fosfatidilserina.

Para la doble tinción con anexina V-PE/7AAD se empleó el kit de detección de apoptosis BD Biosciences™ (*Detection Kit Annexin V-PE Apoptosis*), siguiendo las instrucciones del fabricante. El *pool* de individuos utilizado para la obtención de muestras de hemolinfa para el ensayo del cometa, también fue utilizado para la tinción con anexina.

Las muestras de hemolinfa se incubaron con concentraciones de AO de 10, 50, 100, 200 y 500 nM a 1 y 2 horas, utilizando como control negativo DMSO (Dimetilsulfóxido. SIGMA) y como positivo una muestra incubada con Camptotecina (4 µM) durante 4 horas.

Tras la incubación, se centrifugaron las muestras a 250 xg durante 5 min y el *pellet* fue resuspendido en 100 µL de tampón de unión (0,5X) previamente diluido en solución salina (500 mM NaCl en agua destilada). Después, a cada muestra se le añadieron 2,5 µL de anexina V y 2,5 µL de 7-AAD, y se dejaron incubar a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad durante 15 minutos.

Las evaluaciones se realizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson). La plantilla de adquisición para las poblaciones de hemocitos se fijó según Prado-Álvarez *et al.* (2012). Se adquirieron un mínimo de 20.000 eventos, tomando los datos de los canales FL1 (7-AAD) y FL2 (anexina V-PE). Los datos fueron analizados mediante el programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson) y los índices de apoptosis y necrosis se expresaron como los porcentajes de eventos anexina V+/7-AAD- y anexinaV+/7-AAD+, respectivamente.

6. Ensayo del cometa

El protocolo seguido para el ensayo del cometa está basado en la técnica del cometa alcalino descrita por Wilson *et al.*, (1998), con algunas modificaciones desarrolladas por Pérez-Cadahía *et al.*, (2004) para la obtención de la suspensión de células de branquia.

6.1. Extensión de las muestras en los portaobjetos

Una vez finalizado el tiempo de incubación, se centrifugaron las muestras tanto de branquia (500 xg durante 5 minutos a 4°C) como de hemolinfa (250 xg durante 5 min a 4°C). Se

descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 90 μL de agarosa LOW (Gibco BRL, Paisley, Scotland) al 0,5% en KSS. Estos 90 μL se dividieron en dos réplicas de 45 μL cada una y se extendieron sobre un portaobjetos, sobre el cual se había extendido previamente una primera capa de agarosa de punto de fusión normal al 0,5% en agua destilada. Sobre la segunda capa de agarosa se colocó un cubreobjetos (uno para cada réplica) y posteriormente se dejaron los portaobjetos en la nevera durante 20 minutos, para facilitar la solidificación de la agarosa.

Una vez solidificadas las muestras, se retiraron los cubreobjetos y se introdujeron en cápsulas Coplin que contenían una solución de lisis (NaCl 2,5 M, Tris-HCl 10 mM, Na₂EDTA 100 mM, NaOH 250 mM, Sarcosil 1%, a pH=10 y Tritón X-100 añadido justo antes de uso), donde permanecieron durante 1 hora en la nevera y en condiciones de oscuridad.

6.2. Electroforesis, neutralización y tinción

A partir de este punto, todos los pasos se realizaron en condiciones de oscuridad para evitar daño adicional en el material genético.

Una vez finalizado el tiempo de lisis, los portaobjetos se colocaron horizontalmente en una cubeta de electroforesis (a su vez introducida en una bandeja con hielo) y se cubrieron con solución de electroforesis (Na₂EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH>13), donde se incubaron durante 20 minutos. Esta solución alcalina posibilita el desenrollamiento de las hebras de ADN y la expresión de los sitios álcali-lábiles.

Tras la incubación, se sometieron las muestras a una electroforesis a 25V y 300 mA (0,83 V/cm) durante otros 20 minutos. Para neutralizar las condiciones alcalinas en las que se realizó la electroforesis, se realizaron tres lavados, de 5 minutos cada uno, a todos los portaobjetos con una solución de neutralización (Tris-HCl 0,4 M, pH=7,5), preparada y autoclavada el día anterior. A continuación los portaobjetos se colocaron en horizontal sobre el papel de filtro durante 10 min.

Los núcleos embebidos en agarosa se tiñeron con unas gotas de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solución de *antifade*. Una vez añadidas las gotas, se colocaron los

cubreobjetos y se almacenaron a 4°C de temperatura en una caja para portaobjetos, en condiciones de humedad y sellada para impedir la desecación de la agarosa. El análisis se realizó en todos los casos el día siguiente, para evitar en la medida de lo posible la pérdida de fluorescencia.

6.3. Captura y análisis de imagen

La captura de imágenes y su posterior análisis se realizó mediante el programa informático *Comet IV* (Perceptive Instruments). En todos los casos se tomó como parámetro estimador del daño en el ADN el porcentaje de ADN en la cola del cometa (% *tDNA*), medido desde el centro estimado de la célula.

De cada muestra se analizaron 100 células, 50 procedentes de cada una de las réplicas.

7. Análisis estadístico de los datos

En todos los casos, la normalidad de las variables obtenidas en cada experimento se evaluó mediante el test de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov, observándose que las variables se alejaban significativamente de una distribución normal, por lo que se asumieron los test no paramétricos como los más adecuados para el análisis de los datos. Como test no paramétrico, se empleó el análisis de Kruskal-Wallis para muestras independientes, completado con el test *U* de Mann-Whitney, para establecer la existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos realizados.

La existencia de posibles relaciones dosis-respuesta se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

El nivel de significación fue fijado en 5%. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistics para Mac, versión 20 (Illinois, USA).

Resultados

Para poder determinar el efecto directo y a corto plazo que ejerce el AO sobre el ADN de células de hemolinfa y branquia de mejillón, estas fueron expuestas a concentraciones de 10, 50, 100, 200 y 500 nM de AO, en base a estudios realizados previamente (Fórez-Barrós *et al.*, 2011; Prado-Álvarez *et al.*, 2013) por un período de 1 y 2 horas de exposición.

Para los individuos empleados en este trabajo el contenido basal en AO evaluado mediante HPLC dio valores comprendidos entre 10-80 ng por gramo de peso fresco. Valores que se encuentran por debajo del límite legal permitido para el consumo humano.

1. Evaluación de muerte celular por citometría de flujo

Para evaluar el posible papel del AO como inductor de la apoptosis y/o necrosis, se empleó una técnica de citometría de flujo, que utiliza como indicadores la presencia de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática y la captación de 7AAD. Para ello, tras los tratamientos de los hemocitos de mejillón con AO, se llevó a cabo la tinción de las muestras con 7AAD y con Anexina V marcada con ficoeritrina.

Los gráficos de las Figuras 7 y 8 muestran los resultados de estos análisis, indicando el porcentaje de células apoptóticas y necróticas tras 1 y 2 horas de tratamiento con AO, respectivamente.

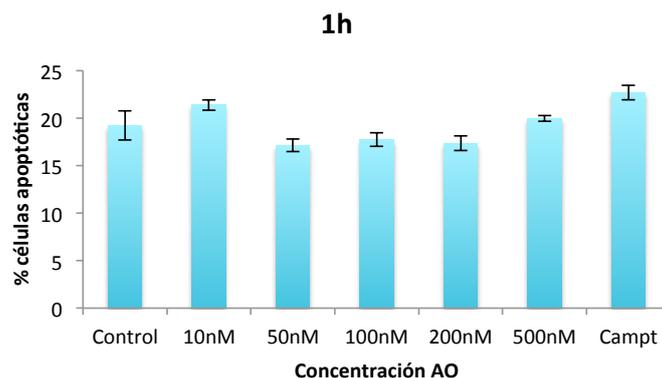


FIGURA 7- Resultados del análisis, realizado mediante citometría de flujo, en células apoptóticas de hemolinfa tratadas con AO durante 1 hora.

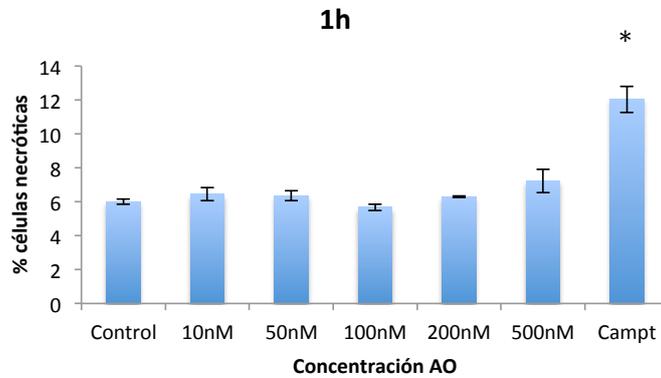


FIGURA 8- Resultados del análisis, realizado mediante citometría de flujo, de células necróticas de hemolinfa tratadas con AO durante 1 hora. (* $P < 0.05$, diferencias significativas respecto al control).

Tras el tratamiento a 1 hora, se observó un ligero descenso en el porcentaje de células apoptóticas entre las concentraciones de 50 y 200 nM de AO. Sin embargo, dicho descenso no resultó estadísticamente significativo. A la concentración más baja y más alta testadas (10 y 500 nM) los niveles de apoptosis resultaron semejantes al control.

Con respecto al porcentaje de células necróticas y tras la exposición a 1 hora de tratamiento, para la concentración de 500 nM se observó un ligero aumento en la necrosis, aunque dicho aumento tampoco resultó estadísticamente significativo. Para el resto de las concentraciones evaluadas los mismos niveles de necrosis mantuvieron niveles similares al control.

Los gráficos de las Figuras 9 y 10 muestran los resultados tras 2 horas de tratamiento.

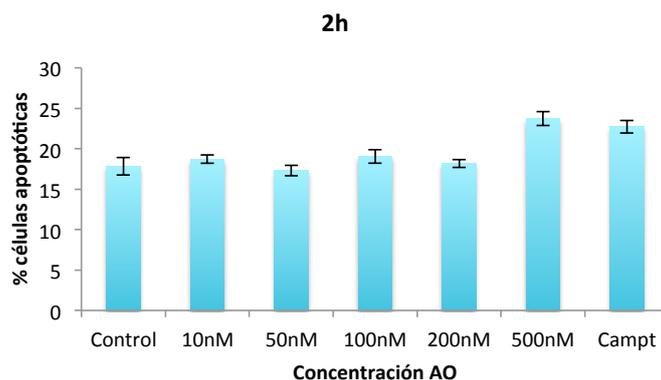


FIGURA 9- Resultados del análisis, realizado mediante citometría de flujo, en células apoptóticas de hemolinfa tratadas con AO durante 2 horas.

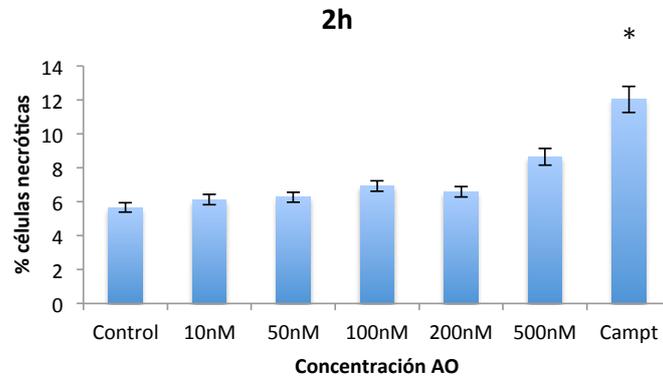


FIGURA 10- Resultados del análisis, realizado mediante citometría de flujo, de células necróticas de hemolinfa tratadas con AO durante 2 horas. (* $P < 0.05$, diferencias significativas respecto al control).

Tras dos 2 horas de tratamiento tanto para el porcentaje de células apoptóticas como necróticas no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles. Sin embargo, cabe indicar que se obtuvo un aumento lineal y una relación dosis-respuesta positiva entre las concentraciones de AO y el porcentaje de células necróticas ($r = 0.442$; $P < 0,01$), y células apoptóticas ($r = 0.348$; $P < 0,05$).

2. Evaluación de la genotoxicidad mediante ensayo del cometa

Los gráficos de las Figuras 11 y 12 muestran los resultados obtenidos mediante ensayo del cometa para las células de hemolinfa. Para evaluar el daño genético asociado a la exposición de AO en este tejido, se utilizó como parámetro estimador el porcentaje de ADN en la cola del cometa (*tDNA*), medido desde el centro estimado de la célula.

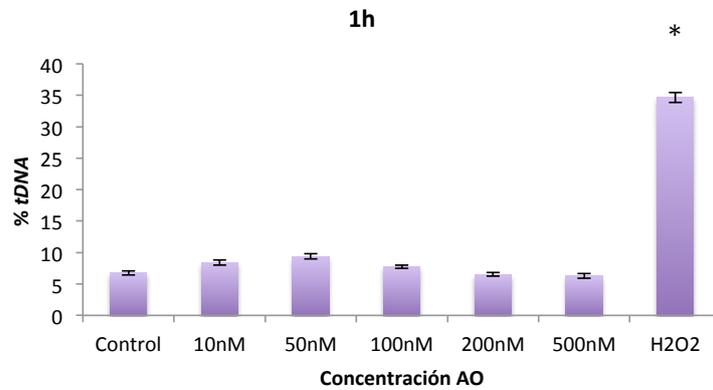


FIGURA 11-. Resultados del ensayo del cometa en células de hemolinfa tras 1 hora de tratamiento con AO. (* $P < 0.05$, diferencias significativas respecto al control).

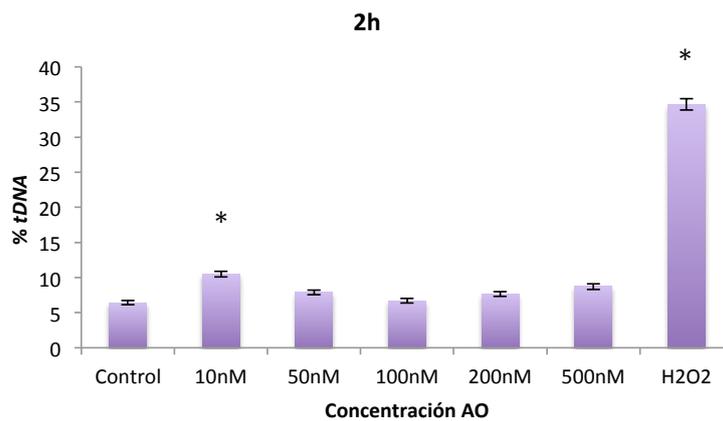


FIGURA 12-. Resultados del ensayo del cometa en células de hemolinfa tras 2 horas de tratamiento con AO. (* $P < 0.05$, diferencias significativas respecto al control).

Tras una hora de tratamiento, el porcentaje de ADN dañado no presento diferencias estadísticamente significativas a cualquiera de las concentraciones analizadas. Sin embargo, si se apreció un ligero aumento del daño a las concentraciones de 10 y 50 nM el cual parece descender a partir de la concentración de 100 nM. Tras dos horas de tratamiento, se mantiene esta tendencia aunque la disminución del daño comienza a concentraciones inferiores (50

nM), siendo el incremento de daño obtenido para la concentración de 10 nM estadísticamente significativo ($P < 0,05$).

Los gráficos de las Figuras 13 y 14 muestran los resultados obtenidos mediante ensayo del cometa en células de branquia. El parámetro empleado en la evaluación fue el mismo que para el tejido anterior (% tDNA).

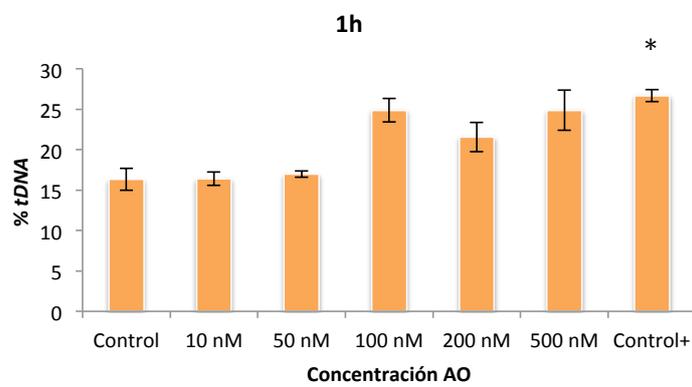


FIGURA 13- Resultados del ensayo del cometa en células de branquia tras 1 hora de tratamiento con AO. (* $P < 0,05$, diferencias significativas respecto al control).

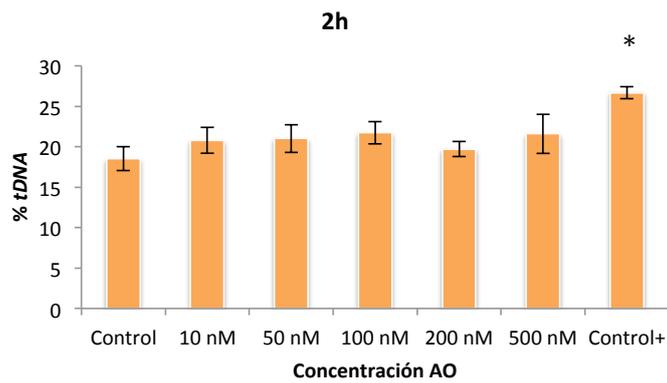


FIGURA 14- Resultados del ensayo del cometa en células de branquia tras 2 horas de tratamiento con AO. (* $P < 0,05$, diferencias significativas respecto al control).

Resultados

Tras una hora de tratamiento, a partir de la concentración de 100 nM se observó un aumento del daño frente al control. Aunque este aumento no resultó estadísticamente significativo, sí obtuvo una relación dosis-respuesta positiva ($r=0.402$, $P<0,05$).

Tras 2 horas de tratamiento, los resultados no mostraron diferencias significativas a ninguna de las concentraciones utilizadas.

Discusión

Como se ha indicado anteriormente, el ácido okadaico (AO) y sus análogos, las dinophysistoxinas (DTX), son toxinas marinas lipofílicas producidas por especies planctónicas y responsables de intoxicaciones diarreicas (DSP) en humanos. Estas toxinas DSP constituyen uno de los grupos más relevantes de toxinas marinas por sus efectos negativos tanto en la salud humana como en la economía (Valdiglesias *et al.*, 2013).

En las últimas décadas, se han investigado los efectos potencialmente tóxicos del AO, principalmente a través de estudios *in vivo* e *in vitro* en células de mamíferos, revelando efectos citotóxicos, neurotóxicos, inmunotóxicos, genotóxicos y carcinogénicos (Valdiglesias *et al.*, 2013), mientras que los estudios destinados a otros organismos son mucho más escasos.

Puesto que los moluscos bivalvos, por su condición filtradora, absorben y acumulan grandes cantidades de esta toxina, consideramos que el estudio de los efectos del AO en dichos organismos supone un aspecto muy importante en este campo de investigación. Pues además, estos organismos constituyen un pilar económico para muchas localidades costeras que anualmente se ven afectadas por la acción de toxinas marinas como el AO.

Evaluación del efecto de la exposición *in vitro* de AO en la muerte celular en el mejillón *M. galloprovincialis*

Los datos recogidos en la bibliografía sobre la inducción de muerte celular por parte del OA son especialmente controvertidos. A pesar de que el AO es un reconocido inductor de la apoptosis en gran variedad de líneas celulares (Santaclara *et al.*, 2005), su actividad promotora de tumores (Fujiki y Suganuma, 1999) y su efecto protector contra la apoptosis inducida por otros compuestos también han sido demostrados (Song *et al.*, 1992; Ahn *et al.*, 2009), pero en mejillón, los estudios realizados hasta el momento son muy escasos. En el presente trabajo se analizaron los efectos citotóxicos del AO sobre células de mejillón por citometría de flujo mediante una doble tinción de los hemocitos con anexina V-PE y 7AAD, cuyo empleo simultáneo permite el análisis de los niveles de células apoptóticas y necróticas en el mismo ensayo.

Discusión

En este trabajo, los resultados indican que tras la exposición de células de hemolinfa a distintas concentraciones de AO durante 1 hora, no se dan variaciones significativas en el porcentaje de necrosis ni de apoptosis. Sin embargo, tras 2 horas de tratamiento, sí se obtuvo una relación dosis-respuesta positiva entre la concentración de AO y el porcentaje de células necróticas.

Estos resultados corroboran los obtenidos por Prado-Álvarez *et al.*, (2012), también en células de mejillón, en los que tras 2 horas de tratamiento a concentraciones bajas de AO no se observaron variaciones significativas en el porcentaje de células apoptóticas. Por otro lado, estudios *in vivo* realizados por los mismos autores en otros moluscos bivalvos como la especie de almeja *Ruditapes decussatus*, sí demostraron un incremento significativo en el porcentaje de células necróticas tras 2 y 4 horas de tratamiento con AO a concentraciones de 100 y 500 nM. Esta tendencia también se observa en los resultados de este trabajo, aunque no se hayan obtenido diferencias estadísticamente significativas a ninguna de las concentraciones. En base a ello, parece que las células de mejillón muestran una resistencia aparentemente mayor que las células de almeja frente al AO.

Evaluación del efecto genotóxico de la exposición *in vitro* al AO en células de mejillón *M. galloprovincialis*

La naturaleza de los efectos genotóxicos del AO no está completamente definida, y las evidencias recogidas por diversos estudios también muestran resultados contradictorios. Este aspecto parece basarse en el hecho de que los efectos genotóxicos del AO dependen en gran medida del tipo celular y de las condiciones experimentales (Valdiglesias *et al.*, 2013). En este estudio, se evaluaron los efectos genotóxicos del AO sobre células de hemolinfa y branquia de mejillón *M. galloprovincialis* mediante la técnica del ensayo del cometa, cuyo empleo permite detectar las roturas de cadena presentes en el ADN de las células y medirlas a través de distintos parámetros. En este trabajo en concreto se empleó el % *tDNA* que indica el porcentaje de ADN presente en la cola del cometa.

En su origen, la metodología del ensayo del cometa fue desarrollada para células de vertebrados, sobre todo mamíferos (Singh *et al.*, 1988), aunque hoy en día es utilizado como

una herramienta de biomonitorización rápida y eficaz de los efectos de los contaminantes sobre el material genético de diversos grupos de invertebrados (Frenzilli *et al.*, 2001, 2009; Taban *et al.*, 2004), cobrando especial importancia en invertebrados marinos (Mitchellmore *et al.*, 1998) y demostrando ser de gran utilidad en numerosos estudios para la determinación de los efectos tóxicos de diversos contaminantes a nivel genético (Frenzilli *et al.*, 2001; Pérez-Cadahía *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos en este trabajo mediante el ensayo del cometa con células de hemolinfa no mostraron daño en el ADN tras la incubación con AO con excepción de un ligero incremento del % *tDNA* a las 2 horas de tratamiento a una concentración de 10 nM. Estos datos coinciden con los de experimentos anteriores realizados *in vivo* en los que se observó una ausencia de daño en hemocitos de la almeja *R. decussatus* alimentadas con distintas concentraciones del alga *Prorocentrum lima*, resultados que se relacionaron también con la presencia de un metabolito menos activo en los hemocitos, y asociándolo a la capacidad fagocítica de éstas células en invertebrados marinos (Flórez-Barrós, 2011).

Estos mismos autores realizaron el primer estudio *in vitro* de evaluación de los efectos genotóxicos del AO en células de hemolinfa de moluscos bivalvos, más concretamente en la almeja *R. decussatus*. Los resultados obtenidos en este caso no sólo no mostraron un incremento del daño evaluado mediante el ensayo del cometa sino que encontraron además un descenso significativo del % *tDNA* a bajas concentraciones de AO tras 2 horas de tratamiento.

Una posible explicación para la ausencia de respuesta positiva de las células de hemolinfa al AO encontrada en estos estudios y en el nuestro propio sería la existencia de una isoforma del citocromo P-450 involucrada en la detoxificación en células del sistema inmune cuya presencia ya ha sido previamente descrita en la almeja *Chamalea gallina* (Monari *et al.*, 2009) y en líneas celulares humanas (Guo *et al.*, 2010). El citocromo P-450 podría convertir el AO en un metabolito de menor toxicidad explicando la ausencia de genotoxicidad en determinadas condiciones como las dadas en este estudio.

Otra explicación para la ausencia de daño observada en los hemocitos podría estar relacionada con el hecho de que este tejido está considerado como el sistema de defensa de invertebrados, debido a que estas células poseen capacidad fagocítica y su citoplasma presenta un porcentaje elevado de lisosomas. De hecho, se considera que existe cierto paralelismo entre estas células

Discusión

de defensa en invertebrados y los linfocitos humanos, que también muestran mayor resistencia a los agentes tóxicos que otros tipos celulares (Valdiglesias *et al.*, 2011).

No obstante, en un estudio reciente Prado-Álvarez *et al.*, (2013) observaron una disminución significativa de la capacidad fagocítica de los hemocitos tratados *in vitro* con AO a concentraciones de 10, 50, 100 y 500 nM en la especie de almeja *R. decussatus*, por lo que en un futuro sería interesante estudiar si se produce este mismo efecto en hemocitos de mejillón.

Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo para células de branquia únicamente mostraron una relación dosis-respuesta positiva para el tratamiento con AO durante 1 hora, pero este efecto parece perderse tras 2 horas de tratamiento. Resultados similares fueron aportados por Flórez-Barrós *et al.*, (2011), en un estudio *in vivo* en tejido branquial de la almeja *R. decussatus*, donde observaron que el daño genético inducido por AO era mayor en los casos en los que se habían utilizado menores concentraciones de *P. lima* y durante menos tiempo.

Es posible que el aparente descenso de daño genotóxico en células de branquia a concentraciones más elevadas y tiempos de exposición más largos se deba a que el daño basal de las células es más elevado, provocando que las posibles diferencias respecto al control que pudiesen ser detectadas tras 1 hora de tratamiento desaparezcan a las 2 horas. Flórez-Barrós *et al.*, (2011) propusieron como posible explicación para la disminución del daño genético observado en células de branquia de *R. decussatus* un efecto apoptótico del AO que provocara la muerte de las células dañadas, por lo que las células analizadas mediante ensayo del cometa serían solamente aquellas más resistentes a los efectos de la toxina y por tanto menos dañadas. De cara a estudios futuros, sería importante la puesta a punto de un protocolo que permitiera el análisis de células individuales de branquia mediante citometría de flujo, de la misma forma que se ha realizado en el presente trabajo con células de hemolinfa.

Este trabajo aporta una mejora en los conocimientos de los efectos citotóxicos y genotóxicos del AO a concentraciones bajas y tiempos de exposición cortos en dos tipos celulares del mejillón *M. galloprovincialis*. En base a las escasas diferencias significativas obtenidas, debemos considerar que estos test no son adecuados como herramienta de biomonitorización de contaminación por AO en el medio marino. Una vez más, estos resultados ponen de

manifiesto la existencia de un posible mecanismo de protección frente a los efectos nocivos del AO en moluscos bivalvos, y la diferente sensibilidad según el tipo celular utilizado. Por tanto, los datos aportados por los presentes ensayos citogenéticos aportan una visión preliminar que debe ser complementada con herramientas moleculares que ayuden a clarificar el mecanismo de acción del AO en estos organismos.

Conclusiones

1. El estudio de células de hemolinfa por citometría de flujo mostró que el AO no ejerce efectos citotóxicos a ninguna de las concentraciones y tiempos de exposición utilizados.
Sin embargo, los resultados obtenidos muestran una relación dosis-respuesta positiva en cuanto al número de células necróticas tras 2 horas de exposición al AO.
2. El ensayo del cometa no ha mostrado un incremento del daño genotóxico en células de hemolinfa, a excepción de las sometidas a la menor concentración de AO empleada (10 nM) y a un tiempo de exposición de 2 horas.
3. Con respecto a las células de branquia, no se observaron diferencias significativas a ninguna de las concentraciones utilizadas, pero sí una correlación dosis-respuesta positiva tras 1 hora de exposición a AO.
4. Estos resultados parecen indicar que las células de hemolinfa presentan mayor resistencia ante la acción del AO que las células de branquia.

Referencias Bibliográficas

Adamo, R.D., Pelosi, S., Trotta, P., Sansone, A. (1997). *Bioaccumulation and biomagnification of PAH in aquatic organisms*. Mar. Chem. 56: 45-49.

Ahn, K.H., Kim, Y.S., Kim, S.Y., Huh, Y., Park, C., Jeong, J.W. (2009). *Okadaic acid protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis*. Neurosci. Lett. 449: 93-97.

Daranas, A.H., Norte, M., Fernández, J.J. (2001). *Toxic marine microalgae*. Toxicol. 39: 1101-1132.

Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P. (2009). *Major cell death pathways at a glance*. Microbes. Infect. 11: 1050-1062.

Elmore, S. (2007). *Apoptosis, a review of programmed cell death*. Toxicol. Pathol. 35: 495-516.

Fernández, J.J., Cadenas, M.L., Souto, M.L., Trujillo, M.M., Norte, M. (2002). *Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes*. Curr. Med. Chem. 9: 229-262.

Fladmark, K.E., Serres, M.H., Larsen, N.L., Yasumoto, T., Aune, T., Doskeland, S.O. (1998). *Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes*. Toxicol. 36: 1101-1114.

Flórez-Barrós, F., Prado-Álvarez, M., Méndez, J., Fernández-Tajes, J. (2011). *Evaluation of genotoxicity in Gills and Hemolymph of clam Ruditapes decussatus fed with the toxic dinoflagellate Prorocentrum lima*. J. Toxicol. Environ. Health. 74: 971-979.

Fisher, N.S., Teyssié, J.L., Fowler, S.W., Wang, W.X. (1996). *Accumulation and retention of metals in mussel from food and water: a comparison under field and laboratory conditions*. Environ. Sci. & Tech. 30: 3232-3242.

Frenzilli, G., Bosco, E., Barale, R. (2000). *Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds*. Mut. Res. 468: 93-108.

Referencias Bibliográficas

Frenzilli, G., Nigro, M., Scarcelli, V., Gorbi, S., Regoli, F. (2001). *DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the mediterranean mussel, Mytilus galloprovincialis: a field of study in highly eutrophicated coastal lagoon*. Aquatic Toxicol. 53: 13-9-32.

Frenzilli, G., Nigro, P., Lyons, B.P. (2009). *The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments*. Mut. Res. /Reviews in Mut. Res. 681: 80-92.

Fujiki y Suganuma, 1999 → Fujiki, H., Suganuma, M. (1999). *Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters*. J. Cancer. Res. Clin Oncol. 125: 150-155.

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 (Basel). 2: 878–904.

Golberg, E.D. (1975). *The mussel watch: a first step in global monitoring*. Mar. Poll. Bull. 6:11.

Guo, F., An, T., Rein, K.S. (2010). *The algal hepatotoxin okadaic acid is a substrate for human cytochromes CYP3A4 and CYP3A5*. Toxicol. 55: 325-332.

Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., et al. (2003). *Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay*. Mutagenesis, 18: 45-51.

Landsberg, J.H. (2002). *The Effects of Harmful Algal Blooms on Aquatic Organisms*. Reviews in Fisheries Science. 10: 113-390.

Lee, J.-S.; Igarashi, T.; Fraga, S.; Dahl, E.; Hovgaard, P.; Yasumoto, T. (1989) *Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species*. J. Appl. Phycol. 1:147–152.

Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K. (1998). *DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential values of comet assay in environmental monitoring*. Mutat. Res. 339: 135-47.

Monari, M., Foschi, K., Matozzo, V., Marin, M. G., Fabbri, M., Rosmini, R., and

Serrazanetti, G. P. (2009). *Investigation of EROD, CYP1A immunopositive proteins and SOD in haemocytes of Chamalea gallina and their role in response to B[a]P*. Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol. 149: 382–92.

Östling, O., Johanson, K.J. (1984). *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun, 123: 291–298.

Pérez-Cadahía, B., Laffon, B., Pásaro, E., Méndez, J. (2004). *Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (Mytilus galloprovincialis) exposed to spilled Prestige crude oil*. Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol. 138: 453–460.

Prado-Álvarez, M., Flórez-Barrós, F., Méndez, J., Fernández-Tajes, J. (2013). *Effect of okadaic acid on carpet shell clam (Ruditapes decussatus) haemocytes by in vitro exposure and harmful algal bloom simulation assays*. Cell Biol. Toxicol. 29: 189–197.

Prado-Álvarez, M., Flórez-Barrós, F., Sexto-Iglesias, A., Méndez, J., Fernández-Tajes, J. (2012). *Effects of okadaic acid on haemocytes from Mytilus galloprovincialis: A comparison between field and laboratory studies*. Mar. Environ. Res. 81: 90–93.

Prego-Faraldo, M.V., Valdiglesias, V., Méndez, J., Eirín, J.M. (2013). *Okadaic Acid Meet and Greet: An Insight into Detection Methods, Response Strategies and Genotoxic Effects in Marine Invertebrates*. Mar. Drugs. 11: 2829–2845.

Rábade, T. (2010). *Biomarcadores de contaminación del medio marino: herramientas citogenéticas y moleculares*. Tesis doctoral. Universidade da Coruña. A Coruña, Galicia.

Reguera, B.; Velo-Suárez, L.; Raine, R.; Park, M.G. (2012). *Harmful Dinophysis species: A review*. Harmful Algae. 14: 87–106.

Santaclara, F., Lago, J., Vieites, J.M., Cabado, A. G. (2005). *Effect of okadaic acid on integrins and structural proteins in BE(2)-M17 cells*. Arch. Toxicol. 79: 582–586.

Schmid, I., Krall, W.J., Uittenbogaart, C.H. et al., (1992). *Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry*. Cytometry 13: 204–8.

Referencias Bibliográficas

- Sellner, K.G., Doucette, G.J., Kirkpatrick, G.J. (2003). *Harmful algal blooms: causes, impacts and detection*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 383-406.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988). *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Exp. Cell. Res., 175: 84-91.
- Song Q., Baxter, G.D., Kovacs, E.M., Findik, D., Lavin, M.F. (1992). *Inhibition of apoptosis in human tumour cells by okadaic acid*. J. Cell. Physiol. 153: 550-556.
- Svensson, S. (2003). *Effects, Dynamics and Management of Okadaic Acid in Blue Mussels, Mytilus edulis*. Ph.D. Thesis, Göteborg University, Göteborg, Sweden,
- Shumway, S.E. (1995). *Phycotoxin-related shellfish poisoning: Bivalve molluscs are not the only vectors*. Rev. Fish. Sci. 3: 1–31.
- Taban, I.C., Bechmann, R.K., Torgrinsen, S., Baussant, T., Sann, A. (2004). *Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay*. Mar. Environ. Res., 58: 701-705.
- Tachibana, K.; Scheuer, P.J.; Tsukitani, Y.; Kikuchi, H.; van Engen, D.; Clardy, J.; Gopichand, Y.; Schmitz, F.J. (1981) *Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus Halichondria*. J. Am. Chem. Soc. 103: 2469–2471.
- Tohda, H., Yasui, A., Yasumoto, T., Nakayasu, M., Shima, H., Nagao, M., Sugimura, T. (1994). *Chinese hamster ovary cells resistant to okadaic acid express a multidrug resistant phenotype*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 203: 1210–1216.
- Tubaro, A., Florio, C., Luxich, E., Vertua, R., Della Loggia, R., Yasumoto, T. (1996). *Suitability of the MTT-based cytotoxicity assay to detect okadaic acid contamination of mussels*. Toxicol. 34: 965–974.
- Valdiglesias, V., Prego-Faraldo, M.V., Pásaro, E., Méndez, J., Laffon, B. (2013). *Okadaic acid: more than a diarrhetic toxin*. Mar Drugs. 11: 4328-4349.

Valdiglesias, V., Laffon, B., Pásaro, E., Méndez, J. 2011. *Okadaic acid induces morphological changes, apoptosis and cell cycle alterations in different human cell types*. J. Environ. Monit. 13(6): 1831-1840.

Wilson, J.T., Pascoe, P.L., Parry, J.M., Dixon, D.R. (1998). *Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate Mytilus edulis L. (Molusca: Pelecypoda)*. Mutat. Research, 339: 87-95.

Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T., Fujita, N. (1980). *Identification of Dinophysis fortii as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning*. Bull Jpn Soc. Sci. Fish. 46: 1405-1211.

REFERENCIAS WEB

INTECMAR. *Instituto Tecnolóxico para o Control do Medio Mariño de Galicia*. Consellería do Medio Rural e do Mar. Xunta de Galicia. <http://sig.intecmar.org/EstadoZonas/Default.aspx?sm=a1> 2 Junio, 2014.

Laboratorio de Referencia de la Unión Europea de Biotoxinas Marinas. *Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad*. Gobierno de España. http://aesan.msssi.gob.es/CRLMB/web/laboratorio_nacional_referencia/laboratorio_nacional_referencia.shtml 30 Junio, 2014.

Periódico virtual, La Voz de Galicia. http://www.lavozdegalicia.es/santiago/2011/12/14/0003_201112SE14P7991.htm 4 Julio, 2014.

Concluiones