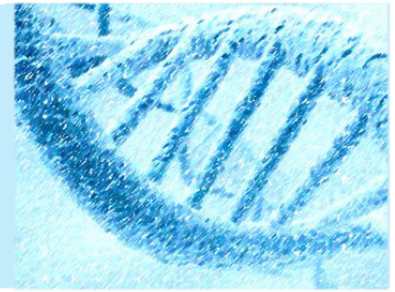


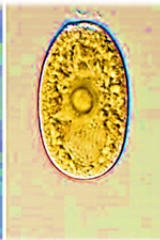
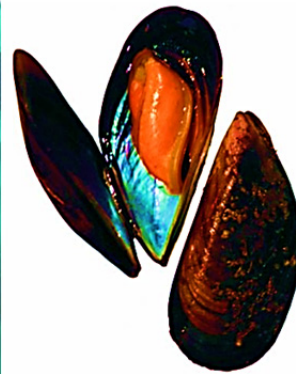
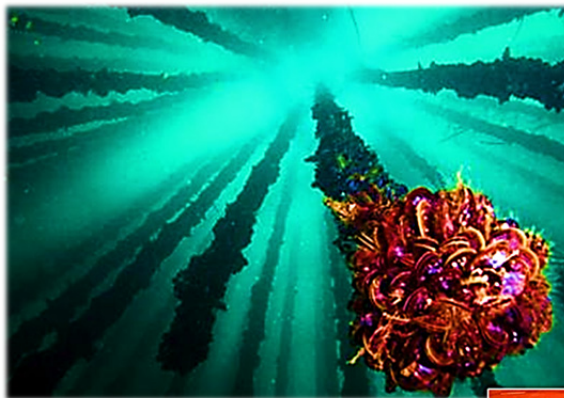
A Coruña, 2015

# TESIS DOCTORAL

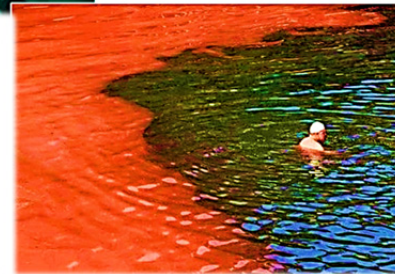
Alexia Sexto Iglesias



## ESTUDIO DEL PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DE MEJILLONES (*M. galloprovincialis*) SOMETIDOS A EXPOSICIÓN CON ÁCIDO OKADAICO. CARACTERIZACIÓN DE LAS FOSFATASAS PP1 Y PP2A.



SCCAP K-1272  
*Prorocentrum lima*



**XENOMAR**  
Genética de organismos marinos



UNIVERSIDADE DA CORUÑA





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
CELULAR Y MOLECULAR

Área de Genética

ESTUDIO DEL PERFIL  
TRANSCRIPTÓMICO DE  
MEJILLONES (*M. galloprovincialis*)  
SOMETIDOS A EXPOSICIÓN CON  
OA. CARACTERIZACIÓN DE LAS  
FOSFATASAS PP1 Y PP2A.

MEMORIA QUE PRESENTA **DÑA. ALEXIA SEXTO  
IGLESIAS** PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

**Directores:** Dra. Josefina Méndez Felpeto  
y Dr. Juan Fernández Tajés







UNIVERSIDADE DA CORUÑA

JOSEFINA MÉNDEZ FELPETO, Doctora en Biología y Catedrática de Universidad del Área de Genética del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidade da Coruña y JUAN FERNÁNDEZ TAJES, Doctor en Biología,

INFORMAN:

Que el trabajo titulado "Estudio del perfil transcriptómico de mejillones (*M. galloprovincialis*) sometidos a exposición con ácido okadaico. Caracterización de las fosfatasas PP1 y PP2A" presentado por Dña. Alexia Sexto Iglesias para optar al Título de Doctora en Biología, ha sido realizado bajo nuestra dirección. Considerándolo finalizado, autorizamos su presentación y defensa.

A Coruña, 04 de Mayo de 2015

Fdo. Josefina Méndez Felpeto

Fdo. Juan Fernández Tajés



Este trabajo se realizó en el marco de dos proyectos nacionales de investigación:

1. *“Evaluación de los efectos de la toxina marina ácido okadaico sobre la respuesta al daño en el ADN: impacto sobre la industria mejillonera y la salud de los consumidores”* (AGL-2008-05346-C02-01), financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (2009-2011).
2. *“Evaluación citogenética y molecular de la respuesta temprana del mejillón *Mytilus galloprovincialis* al ácido okadaico (OA)”* (AGL-2012-30897), financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (2013-2015).



## **AGRADECIMIENTOS**

Tras varios años trabajando en esta tesis, llegó el momento de agradecer a toda la gente que ha contribuido, de forma directa o indirecta, a la finalización de este trabajo.

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los Doctores Josefina Méndez Felpeto y Juan Fernández Tajés, directores de esta memoria de Tesis Doctoral, por abrirme las puertas de su laboratorio.

Máxime y muy especialmente gracias a Juan por su constante apoyo y su firme orientación incluso a horas intempestivas y a miles de kilómetros de distancia *vía Skype*.

Quiero manifestar mi gratitud en general hacia todos los compañeros de laboratorio y en especial a los Doctores José M. Eirín López y Rodrigo González Romero por su inestimable ayuda.

Gracias a los amigos que siempre han estado ahí, por vuestro afecto, por tantas horas de diversión y por animarme las “pocas” veces que lo necesité.

Y por último pero no por ello menos importante, gracias a mis padres, por vuestra inquebrantable atención y vuestros consejos. Gracias por vuestro apoyo y paciencia en momentos difíciles, y por convencerme de que el esfuerzo siempre vale la pena.





## **RESUMEN**

El interés por la Transcriptómica en moluscos bivalvos se ha incrementado notablemente en la última década debido en gran parte al papel que estos organismos desempeñan en Acuicultura y a su utilización en el ámbito de la monitorización ambiental. Entre todos ellos, el mejillón es considerado un bioindicador o centinela de contaminación marina y actualmente existen diversos trabajos que evalúan los efectos desencadenados a distintos niveles en este organismo por la presencia de tóxicos en el medio.

En este trabajo se estudiaron las diferencias existentes en el perfil transcriptómico de mejillones control respecto a mejillones incubados de forma controlada con el dinoflagelado *Prorocentrum lima* productor de ácido okadaico (OA).

Para ello, se construyeron 8 **genotecas de sustracción** (SSH) pertenecientes a dos tejidos (branquias y hepatopáncreas) de mejillones control y tratados, con el objetivo de identificar una serie de genes sobrerrepresentados (en controles respecto a tratados y/o viceversa) que conforman la respuesta al OA. Además se evaluó la **expresión génica a tiempo real** (PCR-RT) de 22 genes elegidos entre todos los obtenidos en las genotecas SSH.

Con todo ello, se encontró que esta respuesta ante la presencia del tóxico ocurría de forma temprana y diferenciada según el

tipo de tejido y la intensidad del tratamiento, aunque en general se trata de una respuesta de aclimatación sometida principalmente a dos frentes: procesos celulares relativos al citoesqueleto (transporte del tóxico), y procesos metabólicos relacionados con la detoxificación (eliminación del tóxico).

Por otra parte, dada la ausencia de datos anotados sobre la secuencia de fosfatasas (PPs) en mejillón y debido al interés que suscita el fenómeno de inhibición que estas proteínas sufren por acción del OA, se caracterizaron varias subunidades de PPs en mejillón. Para ello, en este trabajo se partió de las secuencias correspondientes a PPs encontradas en las genotecas SSH que se extendieron por **3'-5'RACE**. En concreto, se ha llevado a cabo la caracterización y el **análisis filogenético** de siete subunidades de las fosfatasas PP1 y PP2A aisladas y secuenciadas en *Mytilus galloprovincialis* expuestos y no expuestos a OA. Los resultados obtenidos no mostraron cambios significativos en la subunidad catalítica de PP2A y apuntaron a posibles diferencias en una de las subunidades catalíticas de PP1 identificadas.

## **ABREVIATURAS**

µg: microgramo ( $10^{-6}$  gramos)

µL: microlitro ( $10^{-6}$  litros)

µM: micromolar ( $10^{-6}$  moles/L)

3'-5'RACE: *3'-5' rapid amplification of cDNA ends*

aa: aminoácido

ADN: ácido desoxirribonucleico

AN Ref: secuencia anotada del grupo control

AN Test: secuencia anotada del grupo tratado

Agua mQ: agua ultra pura filtrada y purificada por ósmosis inversa

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: adenosín trifosfato

BP: procesos biológicos de GO

Ca<sup>+2</sup>: ión calcio

cDNA: ADN complementario por retrotranscripción

cm.: centímetro

CO III: citocromo oxidasa III

CYT P-450: citocromo P-450

dNTPs: desoxinucleótido (dATP, dTTP, dCTP y dGTP)

dscDNA: ADN de doble cadena

DSP: diarrhetic shellfish poisoning

DTT: ditioneitol

DTX: dinofisistoxina

EF-2: gen *housekeeping* factor de elongación 2

EST: *Expression Sequence Tag*

F/R: *forward/reverse* (genotecas)

FAO: *Food and Agriculture Organization* o Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

GO: *Gene Ontology*

GTP: guaninosín trifosfato

HAB: *harmful algae bloom*

HSP71: *heat shock protein 71*

K<sup>+</sup>: ión potasio

kDa: kilodalton

L: litro

LC-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

MBC: ácido nucleico de branquia de mejillón control

MBT200: ácido nucleico de branquia de mejillón incubado 1 día con 200 células de *Prorocentrum lima* por L

MBT20000: ácido nucleico de branquia de mejillón incubado 1 día con 20000 células de *Prorocentrum lima* por L

MF: funciones moleculares de GO

Mg<sup>+2</sup>: ión magnesio

MGC: ácido nucleico de hepatopáncreas de mejillón control

MGT200: ácido nucleico de hepatopáncreas de mejillón incubado 1 día con 200 células de *Prorocentrum lima* por L

MGT20000: ácido nucleico de hepatopáncreas de mejillón incubado 1 día con 20000 células de *Prorocentrum lima* por L

min: minutos

mV: milivoltios (10<sup>-3</sup> voltios)

n: base no identificada

Na<sup>+</sup>: ión sodio

NADPH: coenzima dinucleótido de nicotinamida-adenina fosfato reducida

ng: nanogramos ( $10^{-9}$  gramos)

NoA Test: secuencia no anotada del grupo tratado

NoA Ref: secuencia no anotada del grupo control

nt: nucleótido

OA: ácido okadaico

ORF: *Open Reading Frame* o marco de lectura abierto

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa para amplificar fragmentos de ADN

PCR-RT: PCR a tiempo real

PM: Peso Molecular

PP1 CAT: isoforma de la subunidad catalítica de PP2A

PP1: proteína fosfatasa 1

PP2A CAT: isoforma de la subunidad catalítica de PP2A

PP2A REG: isoforma de alguna subunidad reguladora de PP2A

PP2A: proteína fosfatasa 2A

PPP: *phosphoprotein phosphatase*

RIN: valor de integridad para un ARN

RT: retrotranscripción

s: segundos

*Sequence* ID: código identificador de una secuencia subida a GeneBank

Ser: aa serina

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

sscDNA: ADN de cadena sencilla

SSH: librerías de sustracción

TF-AP1: gen *housekeeping* factor de transcripción AP1

TFF: *trefoil factor*

Thr: aa treonina

Tyr: aa tirosina

UE: Unión Europea

UV-VIS: espectroscopía ultravioleta visible

Valor E o E-value: parámetro que describe el número de resultados de homología de la secuencia dada esperados por azar en una determinada base de datos

Valor p o *p-value*: probabilidad de obtener un resultado tan extremo al menos como el que realmente se ha obtenido

$\omega$ : coeficiente de selección



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1. CULTIVO DEL MEJILLÓN EN GALICIA .....	3
1.1. HISTORIA DE LA MITICULTURA .....	3
1.2. LAS BATEAS .....	3
1.3. IMPACTO SOCIOECONÓMICO .....	6
2. <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i> .....	7
2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN .....	7
2.2. ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA.....	8
2.3. MEJILLONES COMO ORGANISMOS CENTINELA .....	11
2.4. GENÓMICA Y TRANSCRIPTÓMICA.....	12
3. EPISODIOS TÓXICOS .....	16
4. TOXINAS MARINAS .....	19
5. SÍNDROME DIARREICO TÓXICO (DSP) Y OA.....	26
6. FOSFATASAS (PPs).....	28
6.1. MECANISMO DE FOSFORILACIÓN-DESFOSFORILACIÓN .....	29
6.2. ESTRUCTURA DE LAS FOSFATASAS .....	30
6.3. CLASIFICACIÓN DE LAS FOSFATASAS.....	30
6.4. FOSFATASAS Y OA.....	33
7. RESPUESTA DEL MEJILLÓN AL OA .....	33
8. BIOMONITORIZACIÓN DE BIOTOXINAS MARINAS .....	36
9. BIOMARCADORES GENÉTICOS DE DETECCIÓN .....	40
10. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL OA EN LOS MOLUSCOS BIVALVOS.....	42
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
● MATERIALES UTILIZADOS:.....	51

● PREPARACIÓN PREVIA DE MEDIOS: .....	53
● METODOLOGÍA: .....	55
1. MUESTREO Y EXPOSICIÓN EXPERIMENTAL A <i>Prorocentrum lima</i> .....	55
2. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE OA POR LC-MS/MS .....	56
3. EXTRACCIÓN DE ARN.....	56
4. GENOTECAS DE SUSTRACCIÓN (SSH) .....	58
5. LIGACIÓN Y CLONACIÓN .....	64
6. SECUENCIACIÓN CAPILAR CON EL MÉTODO SANGER .....	65
7. ANÁLISIS DE SECUENCIAS OBTENIDAS POR SECUENCIACIÓN CAPILAR CON EL MÉTODO SANGER .....	66
8. SECUENCIACIÓN MASIVA NGS .....	66
9. ANÁLISIS DE SECUENCIAS OBTENIDAS POR SECUENCIACIÓN MASIVA NGS ( <i>NEXT GENERATION SEQUENCING</i> ) .....	67
10. PCR EN TIEMPO REAL (PCR-RT) .....	68
11. DISEÑO DE CEBADORES (NORMALES Y DEGENERADOS).....	72
12. 3'-5' RACE.....	73
13. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE FOSFATASAS (PPs) .....	76
14. EMULACIÓN PROTEICA ESTRUCTURAL DE PP2A.....	77
15. BÚSQUEDA EN BASES DE DATOS DE SECUENCIAS DE PPs.....	78
16. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE PPs.....	78
17. ANÁLISIS DE EVOLUCIÓN MOLECULAR Y PRESIÓN EVOLUTIVA DE PPs .....	79
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>81</b>
1. ESTUDIO DE LAS GENOTECAS SSH SECUENCIADAS POR EL MÉTODO SANGER .....	83
1.1. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE OA.....	83
1.2. ANÁLISIS GLOBAL DE LAS GENOTECAS .....	84
1.3. ANÁLISIS DE LAS GENOTECAS DE BRANQUIA .....	90
1.4. ANÁLISIS DE LAS GENOTECAS DE HEPATOPÁNCREAS .....	93

2.	ESTUDIO DE LAS GENOTECAS SSH SECUENCIADAS POR SECUENCIACIÓN MASIVA NGS .....	95
3.	ESTUDIO TEMPORAL DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE INTERÉS SELECCIONADOS A PARTIR DE LAS GENOTECAS .....	98
3.1.	CITOESQUELETO.....	99
3.2.	METABOLISMO DE COMPUESTOS EXÓGENOS.....	100
3.3.	METABOLISMO CELULAR.....	101
3.4.	SISTEMA INMUNE Y ESTRÉS .....	102
3.5.	DESARROLLO.....	102
3.6.	BIOMARCADORES POSIBLES DE CONTAMINACIÓN.....	102
4.	CARACTERIZACIÓN DE SIETE SUBUNIDADES RELATIVAS A LAS FOSFATASAS PP1 Y PP2A .....	105
5.	RESULTADOS DE PCR-RT CON LAS SUBUNIDADES CATALÍTICAS DE PP1 Y PP2A.....	115
6.	ANÁLISIS EVOLUTIVO DE LAS SUBUNIDADES CATALÍTICAS DE PP1 Y PP2A .....	117
6.1.	ANÁLISIS EVOLUTIVO DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA PP1 .....	117
6.2.	ANÁLISIS EVOLUTIVO DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA PP2A .....	119
7.	ESTUDIO DE LA NATURALEZA DE LOS EPISODIOS SELECTIVOS IMPLICADOS EN LA DIVERSIFICACIÓN DE LAS SUBUNIDADES CATALÍTICAS DE PP1 Y PP2A.....	121
8.	ANÁLISIS DE LA EMULACIÓN ESTRUCTURAL TRIDIMENSIONAL DE LA HOLOENZIMA PP2A .....	123
	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>125</b>
1.	ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN MEJILLONES TRATADOS CON OA: HERRAMIENTA ÚTIL EN BIOMONITORIZACIÓN AMBIENTAL .....	127
2.	EL ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DEL MEJILLÓN PONE DE MANIFIESTO LA PRESENCIA DE UNA RESPUESTA PRECOZ A LA PRESENCIA DE OA.....	132

3.	EL PROCESO DE ACLIMATACIÓN DE LOS MEJILLONES EXPUESTOS A OA COMPRENDE CAMBIOS A NIVEL DEL CITOESQUELETO, DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y DEL SISTEMA INMUNE.....	134
4.	LA COMPARACIÓN ENTRE LA RESPUESTA AL OA GENERADA EN BRANQUIA Y EN HEPATOPÁNCREAS REVELA DIFERENCIAS DADA SU FISIOLOGÍA Y FUNCIONALIDAD .....	138
5.	GENES ANALIZADOS POR PCR-RT: IDENTIFICACIÓN DE CANDIDATOS A BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A OA .....	140
6.	IMPLICACIONES DE LA CARACTERIZACIÓN DE PP1 Y PP2A EN MEJILLÓN POR PRIMERA VEZ: ESTRUCTURA Y FILOGENIA ....	144
7.	INTERACCIONES ENTRE PP2A Y OA: CASO PARTICULAR DEL MEJILLÓN.....	147
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	149
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>151</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>157</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>193</b>

# INTRODUCCIÓN





## 1. CULTIVO DEL MEJILLÓN EN GALICIA

### 1.1. HISTORIA DE LA MITICULTURA

Desde el siglo VII a.C., de la mano de las primeras poblaciones celtas, existen pruebas (conchales) que vinculan el consumo del mejillón con la comunidad gallega. Es a partir del siglo XVIII cuando comienzan a exportarse barriles de mejillones y otros bivalvos en “escabeche real” a la corte de los Austrias desde las rías gallegas. Pero no fue hasta el siglo XIX cuando comenzaron a producirse las primeras experiencias de cultivo en cercados o estacas, concretamente en la Ría de Arousa, con el objetivo de complementar la creciente demanda de productos pesqueros que no podía ser cubierta por la pesca extractiva. Finalmente en los años 40 se inicia el desarrollo de la miticultura gallega, cuando el propietario de “Viveros de Rial” promueve el método de cultivo de mejillones suspendidos en cuerdas y culmina fondeando la primera batea en la Ría de Arousa en 1945 (**Duran *et al.*, 1990**). Vistos los esperanzadores resultados de este diseño autóctono, estas estructuras se multiplicaron en diversas rías y se mejoraron perfeccionando su vida útil y su capacidad de producción soportando más cuerdas, lo que contribuyó al desarrollo del cultivo y explotación del mejillón en Galicia.

### 1.2. LAS BATEAS

Las rías gallegas presentan unas características en cuanto a su orografía, luz, temperatura y elevada producción primaria, que las definen como un escenario inmejorable para el desarrollo del mejillón de forma natural y/o cultivada, además de otros recursos marinos (**Álvarez *et al.*, 2011**) [*ver Figura 01*].



Figura 01. Mapa que muestra la distribución de acuicultura marina en Galicia actualmente. Sombreado en rosa se destacan las zonas de producción de moluscos, y los puntos azules representan las bateas y otros centros relacionados (Fuente: [http://webserv.mapa.es/visoracuicultura/matlab/gmf\\_apps/butm/utm.phtml](http://webserv.mapa.es/visoracuicultura/matlab/gmf_apps/butm/utm.phtml)).

La batea es una especie de vivero flotante, mediante un sistema de boyas, constituido por un entramado de madera de eucalipto de forma más o menos rectangular sobre el que se suspenden las cuerdas que sostienen los mejillones adheridos [ver Figura 02].

El proceso de cultivo y engorde del mejillón en bateas en las rías gallegas se divide en varias etapas: la obtención de la semilla o “*mejilla*”, el encordado, el desdoble, la cosecha y la selección (Figueras, 2007). Entre los meses de octubre a abril, cuando los mejillones adultos adheridos a las cuerdas liberan sus gametos al mar generando larvas por fecundación, los “*bateeiros*” recogen la mejilla de las rocas del litoral por medio de rasquetas. También, cuando las condiciones oceánicas y ambientales son favorables, la recolección de la mejilla puede llevarse a cabo en épocas de desove (de marzo a junio) por medio

de cuerdas colectoras especiales. Luego, manualmente o por medio de máquinas encordadoras, mediante una red biodegradable se recubren las semillas de 1-2 cm alrededor de las cuerdas para darle tiempo a que embisen.

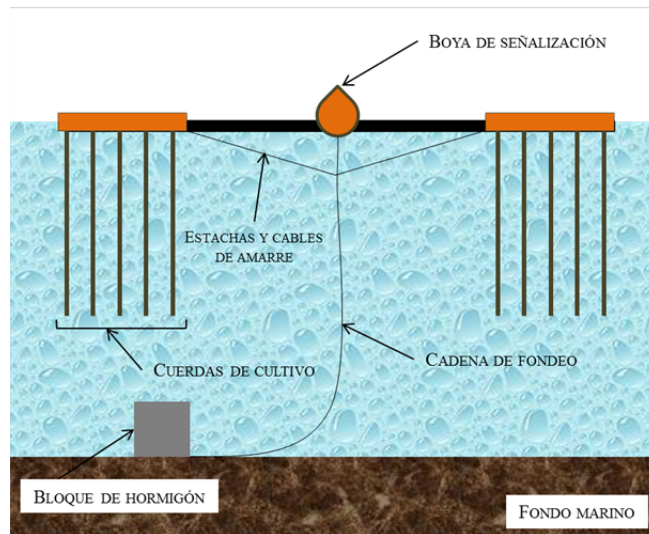


Figura 02. Representación de una batea. Nótese que las cuerdas de cultivo se distribuyen a lo largo de toda la plataforma.

Cuando los mejillones alcanzan los 5 cm aproximadamente, tras 4-6 meses en el mar, se suben las cuerdas y se “desdoblan” dado el aumento notable en el peso del mejillón y como medida para facilitar el crecimiento de los mismos. Finalmente, tras cerca de un año, el mejillón de desdoble alcanza una talla comercial de 8-9 cm. Así, se sacan las cuerdas del agua por medio de grúas, se retiran los mejillones, se limpian y se seleccionan por tallas (Pérez-Camacho *et al.*, 1991) [ver Figura 03].

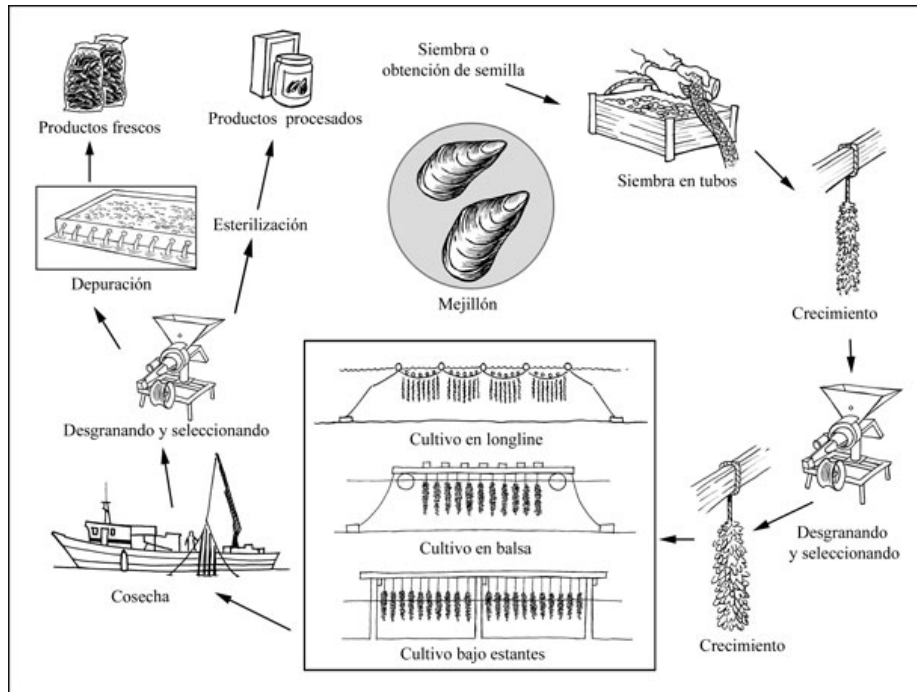


Figura 03. Método de cultivo de mejillones en una batea (Fuente: FAO).

### 1.3. IMPACTO SOCIOECONÓMICO

La miticultura en Galicia, tanto en lo que se refiere a su producción como a la cadena de valor que de ella se deriva, se ha ganado un merecido protagonismo como referente en el contexto mundial, siendo a la vez un importante motor económico de la zona costera y contribuyendo de modo importante al desarrollo de las economías locales (Miranda, 1998). En concreto, la producción media en Galicia de mejillón, según datos de la FAO, se ha mantenido en los últimos años en valores que oscilan entre las 270000 y las 300000 toneladas (MAGRAMA, 2012).

Todo esto sitúa a Galicia a la cabeza en el espacio europeo concentrando la mitad de toda la producción de la UE, y en segundo lugar después de China

como productora mundial de este bivalvo. No obstante, es importante subrayar que el destino mayoritario de la producción china es su utilización como alimento para otros organismos de mayor valor de mercado como por ejemplo el cangrejo azul. Con ello, la miticultura gallega es con diferencia líder mundial por volumen de producción para el consumo humano.

En cuanto al impacto que este sector supone para la economía gallega destacamos, respecto a la producción primaria, la existencia de más de 8000 empleos directos, más de 1000 embarcaciones auxiliares, y cerca de 3300 bateas situadas en las rías gallegas que, aproximadamente, generan un valor anual de aproximadamente 115 millones de euros. Además otros sectores estrechamente vinculados son las empresas proveedoras, las empresas conserveras, los cocederos de mejillón y las plantas depuradoras, y en conjunto proporcionan empleo a más de 2000 personas y facturan anualmente más de 200 millones de euros (**Consello Regulador do Mexillón de Galicia, 2010; OESA, 2011**).

Todo esto sirve para resaltar el importante papel que desempeña el cultivo del mejillón en Galicia, y el hecho de que cualquier cambio que altere su producción repercutirá directamente sobre la economía y la sociedad gallega. Por ello es necesario el estudio de la fisiología del mejillón y de los posibles cambios capaces de alterarla.

## **2. MYTILUS GALLOPROVINCIALIS**

### **2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN**

El mejillón pertenece al *phylum Mollusca*, clase *Bivalvia* (**Linnaeus, 1758**), subclase *Pteriomorphia* (**Beurlen, 1944**), orden *Mytiloidea* (**Ferussac, 1822**),

familia *Mytilidae* (**Rafinesque, 1815**), género *Mytilus* (**Linnaeus, 1758**), siendo las especies más cultivadas y estudiadas *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis* (**Lamarck, 1819**). Su distribución abarca todas las aguas boreales y templadas en todos los océanos y grandes mares del mundo, tanto en el submareal como el intermareal, ocupando una gran diversidad de sustratos (**Koehn, 1991**). Posiblemente su amplia dispersión reside, además de en su elevada tolerancia y plasticidad biológica, en una relación con la fijación de bivalvos en los cascos de barcos (**Branch et al., 2004**).

## 2.2. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA

Los mejillones son organismos dioicos, de fecundación externa en el mar, con un estadio larvario planctónico que sufre metamorfosis y fijación, originando los individuos adultos sésiles que exteriormente carecen de dimorfismo sexual (sí presentan frecuentemente distinta coloración en el manto y en las gónadas). Externamente muestran dos valvas que le otorgan su característica forma longitudinal en hacha, puntiaguda y gruesa en el extremo anterior, y larga muy afilada en el posterior. Estas dos valvas iguales están constituidas de carbonato cálcico y cubiertas externamente por una capa de color negro azulado donde se pueden observar las líneas o estrías de crecimiento concéntricas.

En cuanto al aspecto interno (**Field, 1922; Gosling, 2003**), el cuerpo del mejillón está cubierto por dos lóbulos unidos en su borde anterior que constituyen el manto. La cavidad delimitada por los bordes del manto se conoce como cavidad paleal de cuya cara ventral sale el pie (músculo alargado rojizo) y el biso. Desplegando los lóbulos del manto se aprecian las dos branquias, que además de su función respiratoria constituyen el aparato filtrador del mejillón. Está formada cada una por dos láminas delgadas de filamentos recubiertos de cilios, dándoles un aspecto estriado transversalmente.



En el centro se observa el hepatopáncreas de color café-amarillento sobre el que pasan los músculos retractores del pie de color blanco [ver Figura 04].

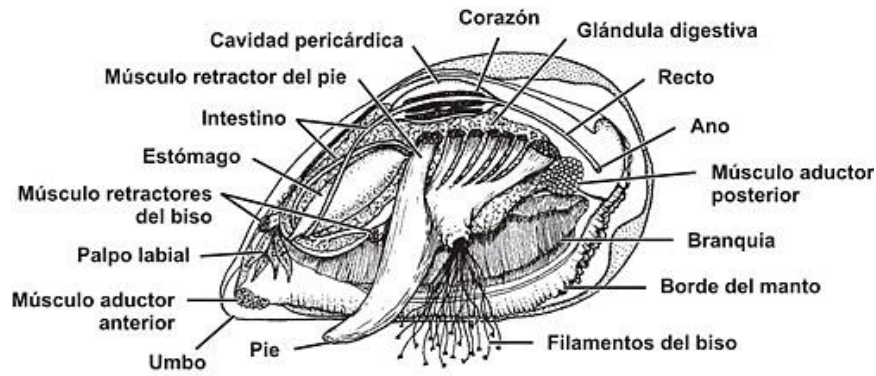


Figura 04. Anatomía interna de un mejillón (Fuente: <http://www.asturnatura.com/>).

El mejillón es, por tanto, un organismo filtrador, que se alimenta reteniendo las partículas de fitoplancton y de detritus orgánicos en suspensión en el agua de mar (seston). Así, el agua entra por el sifón inhalante y atraviesa las branquias donde quedan retenidas las partículas en suspensión. Éstas son transportadas por los cilios hacia los palpos que rodean la boca, mientras que el agua ya filtrada es expulsada por el sifón exhalante [ver Figura 05]. Pero no todas las partículas retenidas en las branquias son ingeridas. Cuando existe una gran carga de alimento, los palpos labiales son capaces de realizar una selección pre-ingestiva para no colapsar el sistema digestivo. Estas partículas desechadas o pseudoheces, embebidas en *mucus*, son eliminadas junto con el agua filtrada a través del sifón exhalante (Widdows *et al.*, 1979; Figueras, 2007).

Por su parte, el alimento ingerido llega al estómago donde se encuentra el estilo cristalino, que al girar por acción de los cilios que presenta el saco del estilo que lo contiene, choca contra el escudo gástrico y libera enzimas digestivas. Con ello, el alimento que llega sufre procesos de ruptura mecánica y es

digerido extracelularmente para pasar, en función de su tamaño, a los divertículos del hepatopáncreas o glándula digestiva.

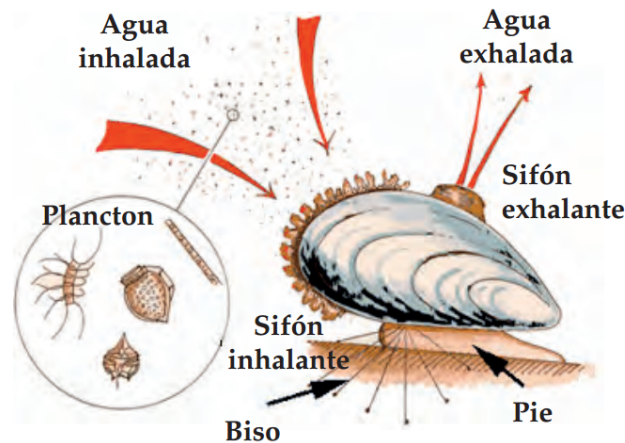


Figura 05. Intercambios realizados con el medio durante la digestión de un mejillón (Fuente: <http://www.magrama.gob.es>).

El hepatopáncreas se compone de dos tipos celulares principalmente, las células digestivas y las células secretoras (Robledo *et al.*, 1997). Las primeras son las más grandes y abundantes, se encargan de la digestión intracelular, detoxificación, biotransformación de xenobióticos y defensa antioxidante (Gosling, 2003). Las células secretoras por su parte, originan ciertas células digestivas y presentan función secretora (Dimitriadis *et al.*, 2004). Pero la cantidad de alimento procesable en un tiempo dado es limitado, por ello, cuando se supera cierto límite, el material en exceso no entra al hepatopáncreas estableciendo también una selección post-ingestiva. Con esto las heces tendrán un componente glandular bien digerido y un componente intestinal con alimento poco digerido y a menudo incluso con células fitoplanctónicas vivas (Widdows *et al.*, 1979).

### 2.3. MEJILLONES COMO ORGANISMOS CENTINELA

El mejillón constituye un importante organismo centinela o biosensor de la contaminación marina dada su excepcional capacidad de filtración, alcanzando valores de hasta 8 L de agua por hora, y su capacidad de bioacumulación debido a su lento metabolismo y al sedentarismo (**Krieger *et al.*, 1981; Chapman, 1997**). Esto le permite incluso poner de manifiesto contaminantes poco concentrados, ofreciendo una alerta temprana frente a diversas toxinas, que pueden ser detectados debido a que el agente tóxico desencadenaría un síndrome de estrés a nivel celular antes de que ocurran graves efectos en el medio (**Livingstone, 1992A; Livingstone, 1992B**).

En términos generales existen varios requisitos que debe cumplir una especie para ser considerada un bioindicador eficiente para un uso adecuado en la monitorización de niveles de contaminación (**Viarengo *et al.*, 1991; Van der Lelie *et al.*, 1994; Hansen *et al.*, 1997**). Entre ellos destacamos los siguientes, que son cumplidos en toda su extensión por mejillones del género *Mytilus*: existencia de un área de distribución conocida y global, disponibilidad a lo largo de todo el año con una densidad de población suficiente y un tamaño adecuado para su manipulación, hábitat de fácil acceso que permita el muestreo, identificación taxonómica sencilla, amplia tolerancia a los cambios en salinidad y turbidez del agua, movilidad reducida (en este caso ausente en la etapa adulta ya que son sésiles), presencia de vías de exposición al tóxico conocidas, bioacumulación de las toxinas, y una elevada resistencia frente a altas dosis de contaminante pareja al desarrollo de alteraciones notables en sus parámetros genéticos (que se traduce en alteraciones en parámetros fisiológicos y bioquímicos).

El mejillón (*M. galloprovincialis*) ha sido ampliamente estudiado como organismo modelo debido a su papel como bioindicador (**Goldberg *et al.*,**

2000), a su valor económico (**Beadman et al., 2002**) y a su importancia ecológica (**Gosling, 1992**). Concretamente se han usado mejillones como organismos centinela para la evaluación de una enorme diversidad de tóxicos presentes en las aguas costeras (**Kira et al., 1989; Cajaraville et al., 1996**) y para la vigilancia biológica de los ambientes marinos (**Cajaraville et al., 2000; Bocchetti et al., 2008**). Es de hecho una de las especies más empleadas para este fin en programas de monitorización europeos, como el MEDPOL (**Gabrieldes, 1997**), el Biomar (**Narbonne et al., 1999**), o el *Mussel Watch* (**Jeng et al., 2000**) que analizan la concentración de hidrocarburos, metales y/o biotoxinas marinas en tejidos del mejillón.

## 2.4. GENÓMICA Y TRANSCRIPTÓMICA

El análisis de las secuencias genómicas de un organismo permite detallar múltiples aspectos de su biología tanto a nivel estructural como funcional, y es en la actualidad una de las herramientas más poderosas y con mayor aplicación en este campo (**Gibson et al., 2004**). Sin embargo, el conocimiento de la estructura y del contenido génico de genomas de organismos bivalvos es muy reducido en comparación a la mayoría de los demás grupos de invertebrados, y claramente inferior si se compara con organismos vertebrados.

En concreto, en lo referente al conocimiento del genoma a nivel global, a pesar de que los organismos invertebrados representan más del 70% de la diversidad mundial de especies, son los menos estudiados alcanzando no más del 30% de los Proyectos Genoma actualmente completados. En la *Figura 06* se aprecian los porcentajes de los Proyectos Genoma completados dentro del Dominio *Eukarya* según el Filo al que pertenecen (GOLD: genome online database). Es de interés aquí el Filo *Mollusca*, uno de los más diversos con más de 100000 especies vivas, en el que se incluye la Clase *Bivalvia* con aproximadamente 20000 especies, entre las cuales se completaron poco más del 0.4% de

Proyectos Genoma. Como prueba de este sesgo, una búsqueda en la base de datos GeneBank por las palabras clave “*Mollusca*” + “*Bivalvia*” ofrece en torno a 700000 secuencias nucleotídicas (entre ellas, tan sólo 380000 ESTs), dentro de los cuales, *Mytilus galloprovincialis* abarca 40000, mientras que si realizamos una búsqueda por “*Human*” o “*Fish*” obtenemos 19 y 11 millones de secuencias nucleotídicas respectivamente (entre ellas, 10 y 6 millones de ESTs en cada caso).

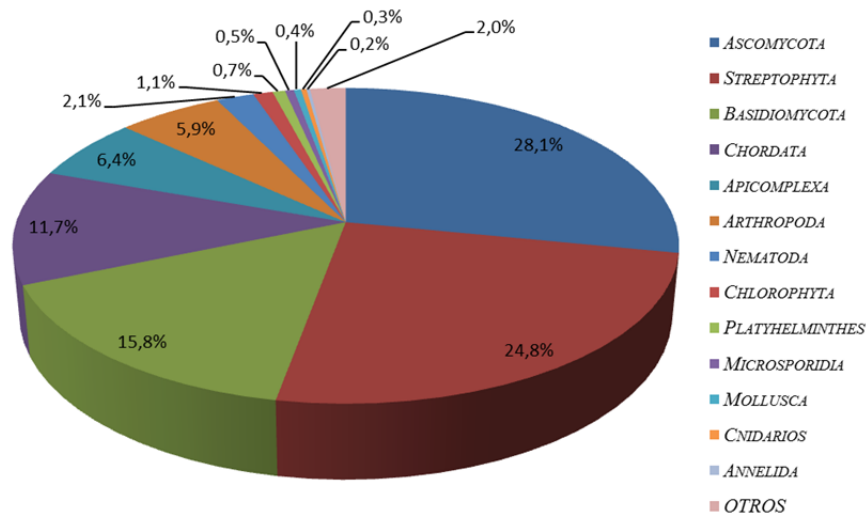


Figura 06. Porcentajes de los Proyectos Genoma completados dentro del Dominio Eukarya según el Filo al que pertenecen (GOLD: genome online database).

En lo referente a invertebrados marinos, los principales estudios a nivel genómico se centran en tres especies de crustáceos: *Penaeus* sp. (langostino más criado del mundo), *Carcinus* sp. (cangrejo de mar común), *Daphnia* sp. (pulga de agua ampliamente usada como indicadores de contaminación o para alimentar a organismos superiores). Además existen otras cinco especies cuyos genomas están ya completamente secuenciados y disponibles en las bases de datos: *Aplysia californica* o liebre de mar ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA\\_000002075.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000002075.1), 2009), *Strongylocentrotus purpuratus* o

erizo de mar púrpura ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000002235.4/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000002235.4/), 2005), un nematodo denominado *Caenorhabditis elegans* ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA\\_000002985.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000002985.1), 2005), *Lottia gigantea* o lapa ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000327385.1/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000327385.1/), 2012) y, el último proyecto culminado, de *Crassostrea gigas* u ostra del Pacífico ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA\\_000297895.1/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000297895.1/), 2012).

Por otro lado, una gran parte de las secuencias de bivalvos presentes en las bases de datos se corresponde a los estudios clásicos realizados con genes individuales (estudios “*single-gene*” en oposición a estudios “*whole-genome*”). La naturaleza de estas secuencias es reflejo del interés que suscita en la comunidad científica el proceso en el que están implicadas, siendo el ejemplo más notable el elevado número de secuencias mitocondriales conocidas en bivalvos. A pesar de representar un pequeño porcentaje respecto al ADN total, han sido objeto de múltiples estudios evolutivos dada la transmisión biparental del ADN mitocondrial en *Mytilus* (herencia uniparental doble) y su consiguiente implicación en la determinación sexual (Zouros, 1994). En lo referente a los genes nucleares se han desarrollado trabajos en bivalvos sobre múltiples procesos tanto de interés biológico (estudios evolutivos u ontogénicos), como de interés aplicado en Biotecnología (estudios sobre la formación de la concha y la adhesión al sustrato) o en Acuicultura (estudios sobre estrés, inmunidad y resistencia a enfermedades o sobre monitorización ambiental) (Saavedra *et al.*, 2006).

Dentro de las posibles aproximaciones en el estudio de la expresión génica se distinguen los “sistemas cerrados”, que requieren un conocimiento previo del genoma de la especie a estudio como p. ej. los microarrays, de los “sistemas abiertos” que no precisan ningún conocimiento previo como p. ej. las librerías de cDNA (Green *et al.*, 2001; Tanguy *at al.*, 2008). Dados los escasos estudios genómicos llevados a cabo en moluscos bivalvos, las aproximaciones

tipo “sistema abierto” son las más numerosas en la bibliografía. Hasta la fecha han sido varios los estudios realizados en bivalvos sobre la identificación de genes y el estudio de su expresión, relacionados generalmente con los cambios sufridos bajo determinadas presiones ambientales. En concreto se realizaron estudios en dos especies de ostra *Crassostrea virginica* y *C. gigas* (Jenny *et al.*, 2002; Gueguen *et al.*, 2003; Tanguy *et al.*, 2004; Quilang *et al.*, 2007), en la almeja *Ruditapes decussatus* (Kang *et al.*, 2006; Gestal *et al.*, 2007), en dos especies de vieira *Pecten maximus* y *Argopecten irradians* (Song *et al.*, 2006) y en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Venier *et al.*, 2003B; Venier *et al.*, 2006; Craft *et al.*, 2010). También se han realizado múltiples estudios de tipo “sistema abierto” con el fin de caracterizar determinada familia de genes en bivalvos y analizar su evolución, como p. ej. los trabajos llevados a cabo con genes del desarrollo (*homeobox Gbx* y genes *POU*) en Pectínidos y otros moluscos (Mesías-Gansbiller *et al.*, 2012; Lozano *et al.*, 2014).

En el caso concreto del mejillón, se realizaron varios estudios con el objeto de identificar posibles genes biomarcadores de exposición a agentes contaminantes tales como el OA (Manfrin *et al.*, 2010), mezclas de tóxicos como metales o compuestos orgánicos (Dondero *et al.*, 2011; Canesi *et al.*, 2011), estrés salino o térmico (Lockwood *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2014), estrés inmunológico (Venier *et al.*, 2011; Philipp *et al.*, 2012; Gerdol *et al.*, 2012) y acidificación oceánica (Huning *et al.*, 2013). El análisis de las secuencias descritas hasta la fecha revelaron que la mayoría de los transcritos encontrados mostraban homología principalmente con genes ribosomales y estructurales, estando las proteínas implicadas en el citoesqueleto muy representadas en el último grupo, y en menor medida con genes implicados en el sistema inmune.

Todos los enfoques genómicos y transcriptómicos (librerías genómicas, colecciones de ESTs, microarrays...) necesitan ir acompañados del progreso de

otros aspectos como el desarrollo de líneas celulares en bivalvos (**Yang et al., 2011**) o un mayor conocimiento de procesos, p. ej. la regulación del crecimiento o la maduración sexual (**Rinkevich, 2005**). La Genómica ofrece múltiples vías extremadamente útiles para incrementar este conocimiento, lo que se traduciría entre otros en importantes mejoras para la Acuicultura de bivalvos. Uno de los aspectos en auge que identifica cada día nuevas secuencias es el estudio de la acumulación de compuestos tóxicos en bivalvos debido a su extendido consumo humano.

### 3. EPISODIOS TÓXICOS

Algunas especies de microalgas planctónicas de las que se alimentan los moluscos bivalvos son capaces de producir compuestos tóxicos que se acumulan en los tejidos del bivalvo y se transmiten a través de la cadena trófica a los niveles superiores llegando incluso al hombre, lo que en ciertas ocasiones supone serios problemas de salud pública [ver Figura 07] (**Shumway, 1995; Rossini et al., 2010; Munday, 2013**). Estos problemas se agravan aún más puesto que muchas de estas ficotoxinas no se alteran con el cocinado ni modifican las condiciones organolépticas de los alimentos que las contienen.

El término “episodio tóxico” (en inglés, *harmful algae bloom* o HAB), comúnmente conocido como “marea roja” aunque no siempre genera esta coloración en las aguas [ver Figura 08] (**Anderson, 1994; Hallegraeff et al., 1995**), se define como una proliferación repentina, no necesariamente masiva, de microalgas (principalmente de dinoflagelados) que liberan endotoxinas desencadenando una bioacumulación de las mismas en los organismos que las consumen (**Sellner et al., 2003**).



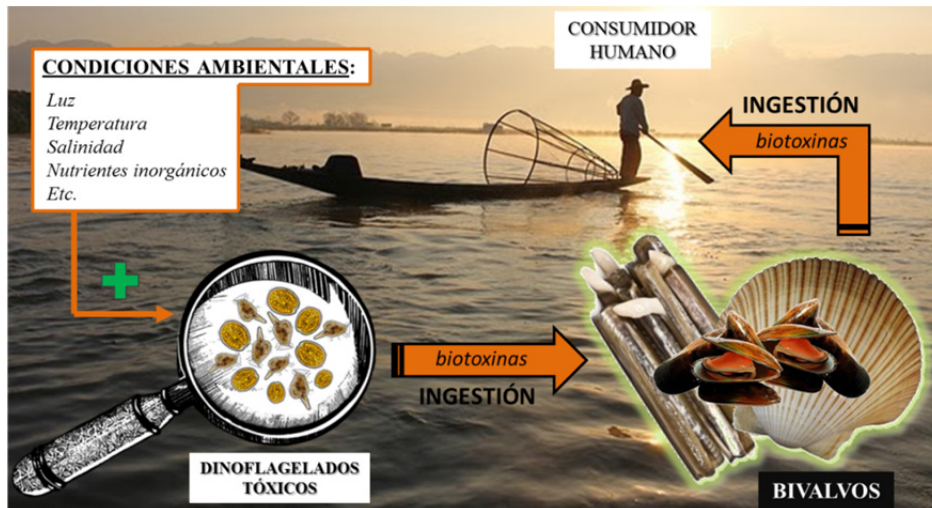


Figura 07. Esquema del impacto sobre la salud humana de las ficotoxinas. Las condiciones ambientales expuestas a la izquierda promueven la proliferación descontrolada de dinoflagelados tóxicos, que son consumidos por los organismos bivalvos que habitualmente se alimentan de otros dinoflagelados. Finalmente, la ingesta de estos bivalvos contaminados por el ser humano transmite la intoxicación generando enfermedades de diversa gravedad.

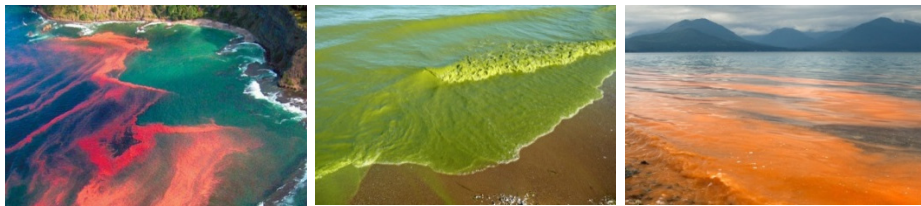


Figura 08. Ejemplos de HABs con distintas tonalidades (Fuente: <http://citpt.lcsc.edu/>).

Actualmente existen diversas teorías acerca de las causas por las que se producen estos espontáneos afloramientos planctónicos. Muchas de ellas apuntan a una estrategia de competencia por el espacio como método de defensa ante el crecimiento excesivo de otros organismos o directamente contra depredadores (**Botana et al., 1996**). Otras teorías apuntan a una emergente idoneidad en las condiciones climáticas atendiendo a temperatura,

turbidez, salinidad del agua, concentración de nutrientes, corrientes, vientos e iluminación (**Wong et al., 2005**). Pero es importante destacar que el aumento de la actividad antropogénica directa o indirectamente a través del cambio climático que eleva la temperatura oceánica promueve su incidencia (**Van Dolah, 2000; James et al., 2010**).

De hecho, recientemente se viene apreciando una mayor incidencia de estos episodios tóxicos, tanto en intensidad como en distribución geográfica (**Anderson et al., 2012**), lo que obliga a la generalización de normativas legales y programas de control, tanto en el medio marino como en los bivalvos, que garanticen la salubridad de los productos marinos para el consumo humano. Para ello se efectúan controles periódicos y lo más común cuando se detecta la presencia de un episodio tóxico, en el caso del cultivo de mejillones, es la paralización o cierre de las bateas afectadas bloqueando la extracción del producto hasta que recupere los límites legales permitidos de toxicidad. Obviamente y dada la importancia mencionada del sector mejillonero en Galicia, esto repercute económica y socialmente causando importantes pérdidas que dependen fundamentalmente de la duración del periodo de cierre y su localización y extensión geográfica.

Para evitarlas, es indispensable conocer las bases de los procesos de incorporación o asimilación, retención o acumulación y eliminación de las toxinas en los bivalvos. Lo esperable inicialmente es que las toxinas, independientemente de su forma de entrada en la célula y debido a que no son constituyentes celulares, en caso de que no se eliminen directamente, sufran biotransformaciones similares a las de los xenobióticos, convirtiéndose en conjugados polares que serían más fácilmente excretados (**Desbiens et al., 1993**). Una de las soluciones más efectiva consiste en transferir a los bivalvos contaminados a aguas libres de tóxicos para favorecer el proceso depurativo.

#### 4. TOXINAS MARINAS

Los episodios tóxicos pueden estar provocados por la presencia de múltiples toxinas de origen fitoplanctónico cuyos efectos sobre la salud en el hombre son muy diversos. De las casi 4000 especies marinas de fitoplancton microscópico que existen, unas 300 pueden proliferar en número tan elevado que alcancen densidades de millones de células por litro de agua, siendo tóxicas alrededor de 60 de ellas (**Lin, 2011**).

La clasificación de estas fitotoxinas marinas ha sido abordada desde diferentes perspectivas, en particular: similitud estructural (**Wright & Cembella, 1998**), distribución taxonómica y filogenética (**FAO, 2005; Wang, 2008**), propiedades químicas (polaridad, carácter lipofílico y otras propiedades) (**Gerssen et al., 2010; La Barre et al., 2014**).

Una clasificación alternativa de las fitotoxinas podría hacerse en base a su modo de acción (**Baden & Trainer, 1993**) o de acuerdo con los síntomas observados en humanos (**Scoging, 1998**), en cuyo caso se pueden considerar siete síndromes de intoxicación causados por los siguientes grupos de toxinas marinas: PSP (*Paralytic shellfish poisoning*), ASP (*Amnesic shellfish poisoning*), DSP (*Diarrhetic shellfish poisoning*), NSP (*Neurotoxic shellfish poisoning*), AZP (*Azaspiracid poisoning*), CFP (*Ciguatera fish poisoning*) y clupeotoxismo.

Los cinco primeros son causados por consumo de marisco contaminado y los dos últimos se deben fundamentalmente al consumo de pescado contaminado (**Underman et al., 1993; Caplan, 1998**), tal y como se refleja en la *Tabla 01* adjunta:

MEDIO DE INTOXICACIÓN	SÍNDROME	TOXINAS
CONSUMO DE MARISCOS	Paralizante (PSP)	Saxitoxinas (STX) y gonyautoxinas (GTX)
	Amnésico (ASP)	Ácido domoico (DA) e isómeros geométricos
	Diarreico (DSP)	Ácido okadaico (OA) y dinofisistoxinas (DTX1 a DTX6) + Pectenotoxinas (PTX) + Yessotoxinas (YTX)
	Neurotóxico (NSP)	Brevetoxinas (PbTX)
	Azaspirácido (AZP)	Azaspirácidos (AZA)
CONSUMO DE PESCADO	Ciguatera (CFP)	Ciguatoxinas (CTX) y maitotoxinas (MTX)
	Clupeotoxismo	Palitoxinas (PITX)

Tabla 01. Clasificación de las ficotoxinas marinas según el medio de intoxicación y los síntomas observados en humanos.

A continuación se detallan brevemente las características químicas de cada toxina y las implicaciones sobre la salud humana generadas por los síndromes que provocan, tanto a nivel orgánico como a nivel molecular.

- *Paralytic shellfish poisoning (PSP)*

Entre las toxinas paralizantes, causantes de PSP, encontramos principalmente a las saxitoxinas (STX) y las gonyautoxinas (GTX). Ambas son tetrahidropurinas con distinta carga neta a pH 7 según los sustituyentes estructurales (**Schantz,**

**1986)**. Son producidas por varias especies de dinoflagelados como *Alexandrium* sp. o *Gymnodinium* sp. y por una única especie de alga verde-azulada denominada *Aphanazomenon flos-aquae* (**Wiese et al., 2010**). El mecanismo de acción es similar al de la tetrodotoxina ya que se unen de forma específica y reversible al sitio 1 del canal de Na<sup>+</sup> dependiente de voltaje, situándose en su parte externa e inhibiendo su apertura. De esta forma disminuyen o impiden la propagación de los impulsos nerviosos, causando desde un entumecimiento hasta la parálisis respiratoria completa (**Shimizu, 1984; Lehane, 2001**).

- *Amnesic shellfish poisoning* (ASP)

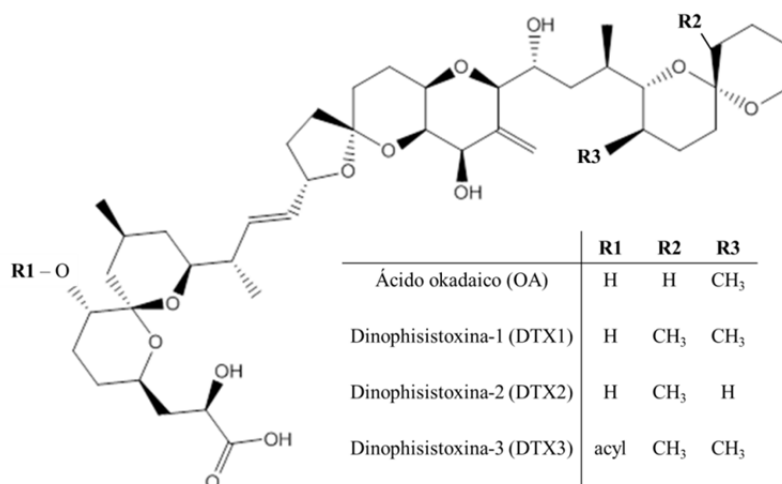
Las toxinas amnésicas son las causantes de ASP y están representadas por el ácido domoico (DA) y sus isómeros geométricos (**Wright et al., 1990**), producidas todas ellas por diatomeas del género *Pseudonitzschia* (**Ramsey et al., 1998**). Son análogos estructurales del aminoácido y neurotransmisor L-glutamato por lo que interfieren en la transmisión sináptica generando un efecto de hiperexcitabilidad y consiguiente daño neurotóxico en determinados receptores tanto a nivel del SNC como del SNP, desencadenando espasmos abdominales, vómitos, desorientación y pérdida de memoria (**Hampson et al., 1998; Pulido, 2008**).

- *Diarrhetic shellfish poisoning* (DSP)

Entre las toxinas diarreicas, causantes de DSP, encontramos tres grupos bien diferenciados de toxinas: uno representado por el ácido okadaico (OA) y sus derivados o dinofisistoxinas (DTX1 a DTX6), otro constituido por las pectenotoxinas (PTX), y otro por las yessotoxinas (YTX) (**Domínguez et al., 2010**). Cabe destacar que se agrupan de este modo dada la existencia de propiedades de solubilidad y lipofilia compartidas, por lo que pueden ser co-

extraídas utilizando los protocolos genéricos de extracción de toxinas, pero en realidad tanto su estructura química como su mecanismo de acción difieren sustancialmente.

En lo referente al primer grupo, que se describirá con mayor detalle debido a su relevancia en el estudio de esta tesis, tanto el OA como las DTX, cuya estructura química se refleja en la *Figura 09*, son producidas principalmente por los dinoflagelados *Dinophysis* spp. y *Prorocentrum* spp. (**Hallegraeff et al., 1995**).



*Figura 09. Estructura química del OA y las DTX.*

Son compuestos polietéreos liposolubles cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de proteínas fosfatasa localizadas en las células del epitelio intestinal. Esto provoca cuadros agudos de sintomatología gastrointestinal caracterizados por diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal, sin haberse producido muertes por este motivo hasta la actualidad (**Haystead et al., 1989**; **Schmitt et al., 2013**). Los síntomas aparecen entre 30 minutos y unas pocas horas después de la ingestión de los moluscos contaminados, y cursan con una recuperación total en tres días. La intensidad de los síntomas depende de la

dosis ingerida y generalmente no se necesita hospitalización (**Lloyd et al., 2013; Valdiglesias et al., 2013**).

En lo que respecta al segundo grupo, es importante subrayar que, al margen de que concurren frecuentemente en muestras naturales con OA y DTX (**MacKenzie et al., 2002**), las PTX y las YTX difieren de ellas en que no causan sintomatología gastrointestinal ni inhiben la actividad de proteínas fosfatasa (**Terao et al., 1986**). De hecho, en base a los efectos hepatotóxicos generados por las PTX (**Espiña et al., 2008**) y YTX (**Tubaro et al., 2010**), estas toxinas podrían incluirse en un nuevo grupo que a modo tentativo podría denominarse HSP (*Hepatotoxic Shellfish Poisoning*). Las PTX son similares estructuralmente al OA y producidas también por *Dinophysis* spp., aunque no inhiben a las proteínas fosfatasas PP2A y PP1 (**Luu et al., 1993; Fladmark et al., 1998**). No se conoce con exactitud su diana intracelular, sin embargo se ha demostrado un efecto sobre el citoesqueleto de actina (**Spector et al., 1999; Ares et al., 2005; Ares et al., 2007**). Las YTX, por su parte, son poliómeros tipo brevetoxinas cuya procedencia radica en los dinoflagelados *Protoceratium reticulatum* y *Lingulodinium polyedrum*. El músculo cardíaco, hígado y páncreas son considerados sus principales dianas (**Tubaro et al., 2010**). Su mecanismo de acción no se conoce completamente pero se ha documentado que es capaz de inducir muerte celular programada a concentraciones nanomolares en diferentes sistemas modelo (**Paz et al., 2008; Korsnes et al., 2011**).

- *Neurotoxic shellfish poisoning* (NSP)

Las toxinas neurotóxicas, denominadas brevetoxinas (PbTX) y causantes de NSP, son compuestos polietéreos consistentes en 10-11 anillos fusionados mediante enlaces éter (**Watkins et al., 2008**). Afectan al SNC alterando la visión, el habla o la ingestión, y en general, causan un síndrome de intoxicación

similar a la ciguatera (**Baden, 1989**). Son producidas por el dinoflagelado *Karenia brevis*. Sus efectos tóxicos se basan en la capacidad de unión a la posición 5 de canales de  $\text{Na}^+$  sensibles al voltaje que conducen a su despolarización. De esta forma se alteran las propiedades de membrana de las células excitables favoreciendo el flujo hacia el interior de iones  $\text{Na}^+$  (**Catterall et al., 1992**).

- *Azaspiracid poisoning* (AZP)

Los azaspirácidos (AZA), causantes de AZP, están formados por un anillo de unión azaspiro, una amina cíclica y un ácido carboxílico (**Twiner et al., 2008; Jauffrais et al., 2012**). Son producidos por dinoflagelados del género *Protoperdinium* y *Azadinium* y, a pesar de que presentan un mecanismo de acción aún por determinar, se sabe que produce una parálisis lenta y progresiva en ratones además de síntomas característicos de tipo diarreico (**Furey et al., 2010**).

Hasta aquí, todas las biotoxinas mencionadas proliferan puntualmente y se relacionan casi exclusivamente con el consumo de marisco contaminado. Las toxinas que se resumen a continuación presentan una distribución o proliferación crónica que afecta principalmente a las zonas tropicales y subtropicales, y además se relacionan esencialmente con el consumo de pescado contaminado.

- *Ciguatera fish poisoning* (CFP)

La ciguatera (CFP) es causada por la presencia de ciguatoxinas (CTX) y maitotoxinas (MTX), ambas producidas por el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus*. La CFP es la intoxicación alimentaria más común a nivel mundial, se debe al consumo de peces contaminados y cursa con problemas de tipo



neurológico, cardiovascular y gastrointestinal (**Lehane et al., 2000; Dickey et al., 2010**). Las CTX son solubles en lípidos y actúan activando los canales de  $\text{Na}^+$  en nervios y músculos (**Bidard et al., 1984**) del mismo modo que las PbTX (**Lombet et al., 1987**). Las MTX son solubles en agua, activan los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  de membrana (**Escobar et al., 1998**) y no están implicadas aparentemente en la sintomatología de ciguatera en humanos. Estas toxinas por tanto actúan directamente sobre las membranas excitables, lo que se traduce en la aparición de potenciales de acción espontáneos que conllevan un incremento de la respuesta contráctil del tejido muscular liso y estriado causando la sintomatología neurológica y/o gastrointestinal.

- Clupeotoxismo

Finalmente, el clupeotoxismo es causado por las palitoxinas (PITX), producidas por dinoflagelados del género *Ostreopsis* (**Onuma et al., 1999; Ramos et al., 2010; Riobó et al., 2011**). En concreto, se trata de una intoxicación debida al consumo de peces y cangrejos de la familia *Clupeidae* que se alimentan de estos dinoflagelados productores de toxina, la cual deriva en cuadros clínicos similares a la ciguatera. Estas toxinas presentan actividad sobre la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  generando una despolarización a nivel de la permeabilidad de la membrana plasmática y causando también problemas neurológicos (**Habermann, 1989; Rossini et al., 2011**).

En Galicia las biotoxinas más frecuentes de las que se realiza un seguimiento continuo y reglamentado son las PSP, DSP y AZA. En este trabajo nos hemos centrado en las toxinas DSP y dentro de ellas en el OA dada su implicación en el sector mejillonero y sus posibles efectos crónicos y subletales. Aunque se trata del grupo de toxinas con repercusiones menos drásticas sobre la salud humana ya que hasta la fecha no se han registrado intoxicaciones letales, su

amplia distribución geográfica y su elevada frecuencia de aparición las convierte en uno de los grupos más importantes en lo relativo al número de cierres de explotación de polígonos mejilloneros que causan a lo largo del año (Valdiglesias *et al.*, 2013).

## 5. SÍNDROME DIARREICO TÓXICO (DSP) Y OA

En el año 1976 se informó por primera vez una intoxicación por OA en Japón, donde varias personas resultaron afectadas, presentando problemas gástricos tras el consumo de bivalvos. Entre 1976 y 1982 se documentaron en Japón unos 1300 casos por intoxicación de DSP. En 1981 se produjeron más de 5000 en España y en 1983 alrededor de 3300 en Francia (Hallegraeff, 1993). Todo ello apunta a un aumento significativo de los casos de intoxicación por toxina diarreica, que puede ser debido tanto a una mayor incidencia de estos episodios como a una mejora en los métodos de determinación de las intoxicaciones.

En las rías gallegas, el OA es la principal toxina detectada en los mejillones, aunque también se encontraron otras toxinas causantes de DSP de menor polaridad (Fernández *et al.*, 1996) siendo el dinoflagelado *Dinophysis acuminata* el principal productor de OA, al margen de la variabilidad que se aprecia de unas rías a otras (Blanco *et al.*, 1998).

El análisis comparativo de la toxicidad relativa a DSP de distintos bivalvos mostró que el más tóxico es el mejillón, seguido de las vieiras y por último las ostras y almejas. En lo referente a los mejillones, están más frecuentemente contaminados y en mayor intensidad aquellos que crecen a poca profundidad (Viviani, 1992). A continuación se presenta un mapa de la distribución mundial de las toxinas DSP creado con las referencias citadas en el ICES-IOC HAEDAT (*Harmful Algae events Database*) de 2013 [ver Figura 10]. Es

importante subrayar la amplia dispersión de esta toxina a nivel mundial, mostrando focos de abundante presencia en toda la costa europea, desde los países escandinavos a zonas muy interiores del Mar Mediterráneo, además de ocupar casi toda la costa de Japón.

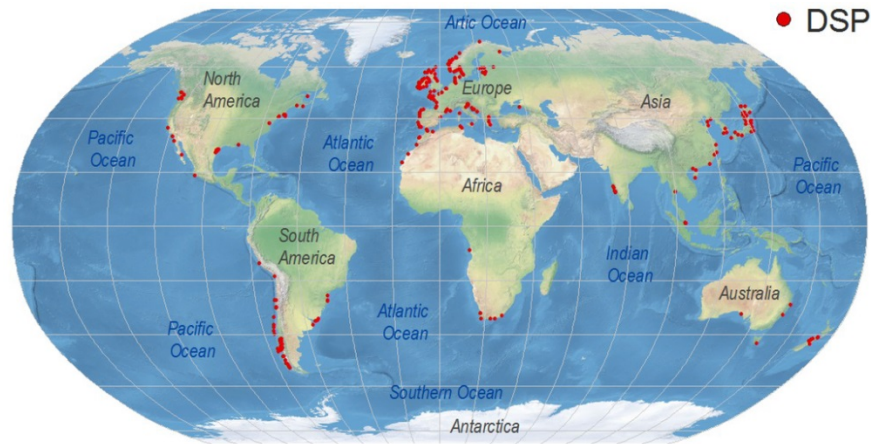


Figura 10. Distribución mundial de las toxinas. Mapa creado en 2013 por la DSP ICES-IOC HAEDAT (Harmful Algae events Database).

La toxicidad de cada especie productora de OA varía espacial y temporalmente por lo que la cantidad de células por litro necesaria para contaminar los organismos marinos es muy variable (Aune & Yndestad, 1993; Botana *et al.*, 1996). Lo que se ha confirmado es que sorprendentemente los mejillones parecen ser insensibles a los efectos citotóxicos y secundarios del OA y otras toxinas diarreicas, lo que explicaría por qué éstos son capaces de acumular altos niveles de este tóxico en sus tejidos grasos y, sin embargo, sobreviven durante largos períodos de exposición (Ciminiello *et al.*, 2006). Pero a pesar de que tanto la acumulación como la purificación de toxinas sea el tema más estudiado en este campo, poco se sabe del tiempo de retención (Hallegraeff *et al.*, 1995) y del mecanismo de acción. En general, la mayoría de los estudios apuntan a la deposición de heces como el mecanismo principal para la liberación rápida de toxinas no asimiladas y de células de dinoflagelado

intactas (**Sedmak & Fanuko, 1991**). Con ello, la hipótesis más aceptada hasta el momento se basa en una respuesta teórica del mejillón a varios niveles ante la presencia de estas toxinas destinada a minimizar de forma precoz sus efectos, siendo significativamente más relevante el ineludible bloqueo de la inhibición que ejercen estas toxinas sobre las fosfatasas (**Nagao *et al.*, 1995**; **Valdiglesias *et al.*, 2013**).

Entre los diversos estudios realizados se ha determinado una relación entre la existencia de moluscos contaminados con OA en las costas francesas y el desarrollo de cáncer de colon en los habitantes de dichas regiones (**Cordier *et al.*, 2000**). Además se ha demostrado que tanto el OA como la DTX1 son promotores tumorales en estudios realizados con animales (**Fujiki *et al.*, 1988**) y que el OA concretamente presenta una marcada actividad mutagénica (**Fessard *et al.*, 1996**), por ello es de elevado interés conocer los riesgos para la salud humana de exposiciones subcrónicas incluso a niveles bajos de estos tóxicos. Se ha expuesto también que el OA, DTX1 y DTX2 son inhibidores específicos de las fosfatasas de proteínas con residuos de serina y de treonina denominadas PP1 y PP2A, siendo la PP2A 200 veces más inhibida que la PP1. Estas fosfatasas están implicadas en la regulación de múltiples procesos celulares, ya que modulan el grado de fosforilación o defosforilación de las proteínas (**Bialojan *et al.*, 1988**; **Fernández *et al.*, 2002**), por lo que la modificación de su actividad da lugar a múltiples cambios a nivel celular.

## 6. FOSFATASAS (PPs)

Aspectos tan importantes como el metabolismo, el transporte de sustancias a través de las membranas, los procesos de conservación, transmisión y expresión de la información genética, y otros muchos, están sujetos a delicados

mecanismos de regulación y control. Una de las bases moleculares más importante sobre la cual descansan estos mecanismos es el ciclo de fosforilación y desfosforilación de proteínas (Shi, 2009; Virshup *et al.*, 2009). De hecho, aproximadamente un tercio de todas las proteínas intracelulares están sujetas a regulación por fosforilación.

### 6.1. MECANISMO DE FOSFORILACIÓN-DESFOSFORILACIÓN

Este mecanismo requiere la acción concertada de dos tipos de enzimas: las proteínas kinasas (PKs) que realizan la fosforilación o transferencia de un grupo  $\gamma$ -fosforilo desde el ATP al grupo OH de determinados residuos aminoacídicos, y las proteínas fosfatasas (PPs) que catalizan la desfosforilación o hidrólisis del enlace éster fosfórico previamente formado [ver Figura 11].

El mecanismo se basa en el hecho de que las proteínas presentan propiedades diferentes cuando están fosforiladas respecto a cuando no lo están. Así, la intensidad de su actividad, su estructura, su estabilidad, su afinidad a ligandos y su localización celular dependen del estado de fosforilación de la proteína (Salazar *et al.*, 2009).

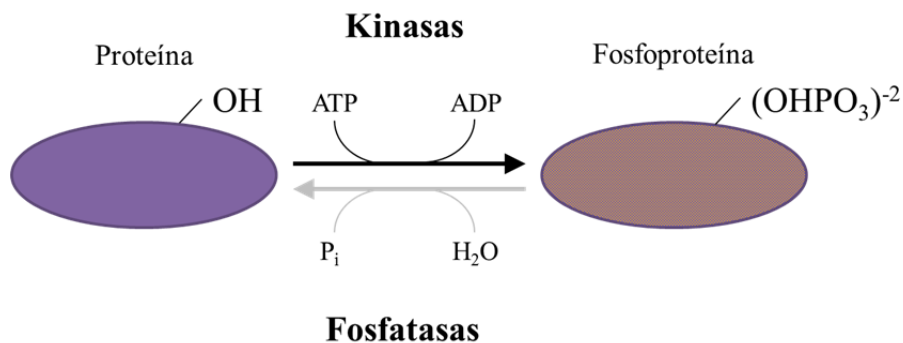


Figura 11. Esquema del mecanismo de fosforilación-desfosforilación.

La adición del grupo fosfato a una proteína o la sustracción del mismo desde una proteína provoca en ella un fenómeno de transconformación que trae como consecuencia un cambio en sus propiedades biológicas y, por lo tanto, una modificación en las características de los procesos en los cuales participan estas proteínas.

## 6.2. ESTRUCTURA DE LAS FOSFATASAS

La naturaleza reversible de la fosforilación sumada a su elevada especificidad de sustrato sugiere que debería haber igual número de PKs como de PPs. Sin embargo, en el genoma humano se han secuenciado más de 500 PKs pero tan sólo en torno a 140 PPs. Esta diferencia se explica mediante la formación combinatorial de holoenzimas de PP, que implica variaciones en la proteína funcional resultante debidas a las diversas combinaciones de subunidades catalíticas con las subunidades reguladoras. Con ello se consigue un número similar de PPs y PKs que regulen específicamente cada reacción (**Sents *et al.*, 2013**).

Así, en cuanto a la estructura cuaternaria de las PPs, destacamos la presencia de tres subunidades: una subunidad catalítica encargada de la reacción *in sensu stricto* que contiene un dominio catalítico conservado de aproximadamente 280 aminoácidos incluyendo una serie de motivos comunes, una subunidad reguladora variable que la dirige a su diana correspondiente, y una subunidad estructural o *scaffold* que ensambla la holoenzima resultante (**Shi, 2009**).

## 6.3. CLASIFICACIÓN DE LAS FOSFATASAS

Tanto PKs como PPs se clasifican según los residuos aminoacídicos donde ocurre la reacción, que en eucariotas pueden ser principalmente tres: serinas

(Ser), treoninas (Thr) y/o tirosinas (Tyr). Por razones funcionales y estructurales se diferencian las PKs y PPs que modifican residuos de Ser/Thr, de las que actúan sobre residuos de Tyr, y de aquellas “duales” capaces de actuar sobre los tres residuos (**Mustelin, 2007**).

En este trabajo nos centraremos en un tipo concreto de PPs por lo que previamente se establecerá una clasificación que se puede apreciar en la *Tabla 02*. Se diferencian cinco superfamilias (**Kenelly, 2001**) según el residuo aminoacídico sobre el que actúan y la similitud en la secuencia consenso del dominio catalítico conservado. En la *Tabla 02* también se refleja la distribución filogenética y el mecanismo catalítico implicado en la reacción de desfosforilación.

En términos evolutivos, es importante señalar que a pesar de que la fosforilación de proteínas parece ser un mecanismo universal de regulación proteica, la amplia variedad de fosfatasas que se conocen hoy en día en eucariotas surgieron mediante eventos de duplicación génica a partir de un único y funcional dominio catalítico ancestral, sumados a posibles fusiones con otros dominios (**Kenelly, 2003; Moorhead et al., 2009**). En concreto, los análisis de fosfatasas de la superfamilia PPP (*phosphoprotein phosphatases*) indican que surgieron con anterioridad a la divergencia de los tres dominios filogenéticos constituyendo, por tanto, las fosfatasas más antiguas. En organismos procariotas también se baraja la posibilidad de transferencia horizontal génica dado que hay escasos tipos de proteínas fosfatasas comunes a todos (**Ponting et al., 1999**). Recientes estudios demuestran también que las plantas superiores son los organismos en los que más implicación tienen los procesos de fosforilación ya que están presentes en casi todas sus rutas de señalización (**Luan, 2003**).

Superfamilia	Miembros	Distribución filogénica			Mecanismo catalítico	Motivo conservado
		A	B	E		
<b>PPP</b> (dependientes de Zn/Fe)	PP1, PP2A, PP2B	+	+	+	Hidrólisis directa sobre residuos aminoacídicos de <b>Ser y Thr</b> principalmente	GDXHG, GDXVDRG, GNH(E/D)
<b>PPM</b> (dependientes de Mn/Mg)	PP2C	-	+	+		(S/T)DGXX - -(D/E/N), D(D/N)X(T/S)
<b>PTP convencional</b>		?	+	+	Dependientes del intermediario enzimático Cys-P, sobre residuos <b>Tyr</b> o indistintamente cualquiera ( <b>“PPs duales”</b> )	D-X <sub>≈30</sub> - HCX <sub>5</sub> R(S/T)
<b>PTP-LMW</b> (de bajo peso molecular)		?	+	+		CX <sub>5</sub> R-X <sub>(85-105)</sub> -DP
<b>Cdc25</b> (“duales”)		-	-	+		D-X <sub>≈45</sub> -CX <sub>5</sub> R

Tabla 02. Clasificación de las fosfatasas según el residuo aminoacídico sobre el que actúan y el mecanismo catalítico implicado. Se distinguen las PPP o “phosphoprotein phosphatases”, las PPM o proteínas fosfatasas activadas por  $Mg^{+2}$ , dos tipos de PTP o “protein tyrosin phosphatase” y las cdc25 o proteínas del ciclo celular que promueven la mitosis por activación del factor promotor MPF. Se aprecia también la distribución filogenética de las mismas según estén presentes en: A o Archaea, B o Bacteria, y E o Eukarya. La última columna refleja los motivos conservados dentro de los dominios catalíticos, donde G significa glicina, D ácido aspártico, X representa cualquier aminoácido, H histidina, V valina, R arginina, N asparagina, E ácido glutámico, S serina, T treonina, C cisteína, y P prolina.



#### 6.4. FOSFATASAS Y OA

Numerosos estudios han demostrado el efecto inhibitorio que el OA ejerce sobre las fosfatasas PP1 y PP2A y estudiado sus posibles implicaciones (**Munday, 2013**). Entre los efectos generados por la inhibición de PP1 y PP2A, es destacable el bloqueo producido a su vez en la activación de las señales extracelulares reguladas por la quinasa 5 (ERK5), un miembro de la familia de las MAP-quinasas activadas por factores de crecimiento y varios tipos de estrés (**García et al., 2002**). Algunos autores indican que PP1 y PP2A participan en el inicio de la mitosis por lo que los efectos que denotan son más drásticos (**del Campo et al., 2013**). Otros sin embargo afirman que la causa de la diarrea en el ser humano es la hiperfosforilación de las proteínas que controlan la secreción de Na<sup>+</sup> de las células intestinales o un aumento de la fosforilación de las proteínas citoesqueléticas o de unión, responsables de regular la permeabilidad a los solutos; lo que ocasiona una pérdida pasiva de fluidos (**Van Egmond et al., 1993; Hallegraeff et al., 1995; Fiorentini et al., 1996; Tripuraneni et al., 1997**).

### 7. RESPUESTA DEL MEJILLÓN AL OA

Los moluscos bivalvos, como el caso del mejillón, están sometidos a cultivos intensivos y se encuentran continuamente afectados por diversos factores estresantes como la presencia de biotoxinas. Como ya se ha mencionado, en los últimos años se ha detectado un incremento considerable en la incidencia de los *blooms* microalgales de especies productoras de biotoxinas. Sin embargo, nunca se ha informado de mortalidades masivas en el mejillón (*M. galloprovincialis*) debidas a estos episodios tóxicos.

En el campo de la Citogenética se han realizado estudios con hemocitos de almejas y mejillones para evaluar su viabilidad celular tras episodios de incubación con OA mediante citometría de flujo que registran un mayor índice de muerte celular a concentraciones elevadas de tóxico (**Prado-Álvarez et al., 2012; Prado-Álvarez et al., 2013**). En otros estudios se llevó a cabo la evaluación del daño genotóxico en diversas estirpes celulares de almejas y mejillones mediante el ensayo del cometa, cuyos resultados revelan una mayor tasa de roturas en el ADN de células branquiales tras incubaciones con bajas concentraciones de OA (**Flórez-Barrós et al., 2011; Pereira et al., 2011**).

En el ámbito de la Transcriptómica existen varios estudios que apuntan a la presencia de mecanismos de defensa en el mejillón ante estas toxinas. En lo que atañe al sistema inmune se han identificado varios genes cuya expresión se eleva tras un episodio tóxico, como son los péptidos antimicrobianos (AMPs) (mitilinas, miticinas, mitimicinas y defensinas) (**Hubbert, 1996; Mitta et al., 1999; Mitta et al., 2000; Gerdol et al., 2012**), la lisozima (**Bachali et al., 2002**), las proteínas de choque térmico (HSPs) (**Kourtidis et al., 2005; Cellura et al., 2006**) o las lectinas (**Venier et al., 2003A**).

Otro punto interesante en la caracterización de la respuesta del mejillón al OA se centra en la detoxificación y/o retención del tóxico. Las toxinas DSP, una vez ingeridas por los mejillones, se acumulan casi exclusivamente en el hepatopáncreas. En el caso concreto del OA, es sabido que su transporte no requiere ATP y tiende a saturarse a altas concentraciones, lo cual sugiere que la difusión simple no es el mecanismo responsable de su absorción. La difusión facilitada u otras vías de entrada alternativas basadas en mecanismos de difusión de dímeros de OA con potasio o de agregados de la toxina disueltos en tampones biológicos podrían ser los mecanismos responsables del transporte a través de las células (**Blanco et al., 2007**).

El OA puede ser transformado o bien durante el proceso de digestión extracelular o, una vez absorbido por las células, por digestión intracelular y metabolización. Hasta la fecha no se conoce cuál es el mecanismo de depuración de estas toxinas aunque son varios los procesos y vías que con bastante probabilidad pueden estar implicados (**Svenson, 2003; Svenson *et al.*, 2004**). Entre ellos destaca como principal vía de depuración la excreción desde las células del hepatopáncreas a las heces, que puede ocurrir bien directamente o bien a través de esférulas de excreción denominándose transporte vesicular. Para esta segunda opción, el OA se une a un receptor celular, cuya naturaleza química más probable es la de una lipoproteína de alta densidad, formando un complejo con un tamaño estimado entre 30 y 300 kDa (**Rossignoli *et al.*, 2010**).

Es llamativo el hecho de que al analizar el contenido en toxinas de las heces se detecta que la mayor parte están constituidas por formas conjugadas del OA y sólo un pequeño porcentaje lo están por OA libre. Por ello se confirma que existen otras vías de depuración que actúan conjuntamente a la anterior, como la degradación de las toxinas o transformación en compuestos no tóxicos, o como la excreción a través del riñón al flujo exhalante. Al respecto, se ha detectado también que la principal forma estructural de depuración de las toxinas DSP es como acil-éster (esterificación del OA), aunque es probable que existan otras formas conjugadas más apolares que todavía no han sido identificadas (**Rossignoli *et al.*, 2011**). Además se ha confirmado mediante experimentos con mejillones tratados con antibióticos que estas reacciones de esterificación no son llevadas a cabo por bacterias u otros microorganismos externos (**Vale, 2010**). Esto revela la existencia de esterasas específicas del OA que actúan en el hepatopáncreas de los mejillones una vez ingerida la toxina generando derivados de ésta menos tóxicos y más fácilmente excretables. Con ello se pone de manifiesto otro posible mecanismo para incidir en la aceleración del proceso de depuración del mejillón, ya que se ha visto

significativamente relacionada la tasa de esterificación del OA y DTXs con la tasa de excreción de sus derivados acilados, de forma que, promoviendo los mecanismos de esterificación se promueve la excreción de los derivados tóxicos (**Moroño *et al.*, 2003; García *et al.*, 2010; Rossignoli *et al.*, 2011**).

## **8. BIOMONITORIZACIÓN DE BIOTOXINAS MARINAS**

En los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias para tratar de mitigar las incidencias de los episodios tóxicos centrándose en los tres agentes fundamentales involucrados en el proceso: el fitoplancton, los moluscos bivalvos y el hombre. Fundamentalmente son tres las vías sobre las que se puede actuar: reducción de la disponibilidad de toxina interviniendo directamente sobre los productores de ésta, selección genética de los organismos cultivados para intentar minimizar de raíz sus efectos y eliminación de toxinas de los organismos una vez contaminados (**Kim, 2006**).

En lo referente al estudio de la biomasa algal productora de toxinas, una herramienta para su control se basa en la cuantificación de sus poblaciones (**Sun *et al.*, 2004**). Pero resulta difícil establecer una correlación cuantitativa entre la cantidad de plancton tóxico y los niveles de toxinas en los bivalvos debido a que la cantidad de toxina por célula es muy variable. Además, las floraciones masivas de algas son impredecibles y la información sobre su inicio es escasa. Por otro lado, eliminar las células algales podría desencadenar la liberación de más toxinas de su interior, y también podría afectar a las células algales beneficiosas de las que se alimentan directamente los organismos marinos (**Scholin *et al.*, 1998**).

En cuanto a la selección genética de organismos, permite partir de individuos reproductores con menor capacidad de captación y/o retención de las toxinas

que la media de la población actual. Por ejemplo sobreexpresando los genes implicados en mecanismos de esterificación de toxinas. Sin embargo esto requeriría un conocimiento más preciso sobre p. ej. el desarrollo de los mecanismos de esterificación del mejillón que permitiría seleccionar una serie de individuos mejor adaptados hacia la eliminación del OA. Un buen ejemplo de resistencia a toxinas se encontró a través de la identificación de una mutación en los canales de Na<sup>+</sup> de la almeja *Mya arenaria* que incrementa su supervivencia tras la exposición a toxinas PSP (**Bricelj et al., 2005**).

Otra forma de tratar de mitigar las consecuencias de los episodios tóxicos pasa por actuar sobre los propios moluscos bivalvos una vez que ya han adquirido la toxicidad, identificando las toxinas presentes y diseñando tratamientos que permitan su eliminación, bien sea *in vivo* o mediante procesado industrial. Esta es la estrategia con mayor calado y representación desde los últimos años (**Prassopoulou et al., 2009**) aunque continúa generando enormes pérdidas económicas. Hasta la fecha, los métodos probados para reducir el contenido de toxinas DSP de bivalvos, como por ejemplo transferir los individuos a aguas sin organismos tóxicos para autodepurarse, desplazar verticalmente los mejillones en la columna de agua para reducir al mínimo la acumulación de toxinas, tratar el agua con ozono, estrés de sal o temperatura, tratamientos de choque eléctrico, disminución del pH o cloración y cocción, no parecen seguros. Algunos son demasiado lentos y otros no son viables económicamente o resultan en productos de aspecto o sabor inaceptables (**Hallegraeff et al., 1993; Anderson, 2009**).

Según esta vía y desde el punto de vista de la salud pública, el control de toxinas marinas en alimentos es necesario para su comercialización evitando de esta forma provocar intoxicaciones alimentarias. El diseño de los programas de monitorización contempla el hecho de que los eventos tóxicos pueden tener lugar en cualquier periodo del año y los niveles de toxicidad pueden afectar

solo a pequeñas áreas. En Galicia esta función es llevada a cabo por el INTECMAR (*Instituto Tecnológico para el Control del Medio Marino de Galicia*). En este centro se hacen mediciones periódicas de la concentración de microalgas en el medio, determinando las distintas especies que se pueden localizar. Además, se recogen muestras de los diferentes moluscos que se explotan para medir la concentración de sustancias tóxicas que pudieran haber asimilado. La recolección y comercialización de moluscos estará permitida siempre y cuando los resultados de tal muestreo determinen niveles de toxinas por debajo de los límites legales permitidos. Actualmente están legisladas las toxinas parálíticas (STXs), amnésicas (DA), lipofílicas (OA y derivados, YTXs y PTXs) y AZA.

El método que se ha utilizado durante mucho tiempo para el control de toxinas lipofílicas en moluscos es el bioensayo en ratón. Para este análisis se utilizan 3 ratones de unos 20 gramos por muestra, a los cuales se les inyecta en la región intra-peritoneal un extracto de toxinas del tejido del molusco. La muerte de 2 de los 3 ratones en 24 horas indica la presencia de toxinas por encima de los niveles permitidos. En este caso, el límite de detección son 160 µg/kg de vianda para OA, DTXs, AZA, YTXs y PTXs juntas (**Comisión Europea, 2004**). Sin embargo, contrastando con la sencilla operabilidad y menor coste que exhibe este método, problemas éticos y dudas generadas sobre los resultados obtenidos han originado gran preocupación en el sector en los últimos años. Entre las dificultades prácticas que presenta este método destacan las siguientes: la relación entre el tiempo hasta la muerte y la concentración de toxinas no es lineal (subjetividad), la determinación exacta del tiempo hasta la muerte es muy trabajosa y puede ocasionar un gran número de falsos positivos (**Suzuki et al., 1996**), conlleva el mantenimiento y sacrificio de un gran número de animales, y además, se detectan todos los componentes de las DSP además de otras toxinas (falta de especificidad) (**Vieites et al., 1996**).

Por ello son varios los autores (**Quilliam ,1995; Suzuki *et al.*, 2011**) que han abogado por el empleo de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) como método de detección universal para todas las toxinas marinas. Esta técnica ofrece un bajo límite de detección de 40 µg/kg de vianda, una alta sensibilidad y la capacidad de enfrentar la diversidad estructural y la naturaleza lábil de las toxinas.

Así, dada la reciente presión social para evitar el uso de animales de experimentación junto con la falta de fiabilidad de los resultados producidos por el método biológico de bioensayo en ratón, se ha redactado un nuevo reglamento que prohíbe este método a partir del 31 de Diciembre del 2014 (**Comisión Europea, 2011**), quedando sustituido por el LC-MS/MS como método de referencia principal. Además, el reglamento que modifica (**Comisión Europea, 2005**) ya contempla el uso de otros métodos analíticos siempre y cuando cumplan el criterio de funcionamiento establecido por el laboratorio de referencia y proporcionen un nivel equivalente de protección de la salud.

Un ejemplo de estos métodos alternativos es el ensayo de inhibición de la fosfatasa, que permite la determinación cuantitativa de OA y otras toxinas del grupo, incluyendo DTX1, DTX2 and DTX3, mediante un método colorimétrico o fluorimétrico basado en la inhibición de una enzima (**Tubaro *et al.*, 1996; Smienk *et al.*, 2012**) y aplicable a especies de moluscos bivalvos tales como los mejillones, almejas, ostras, vieiras, berberechos, etc. En concreto se basa en la capacidad inhibitoria documentada que presenta el OA y DTXs frente a las fosfatasas PP1 y PP2A, que se usa para determinar el contenido de toxinas del grupo del OA mediante un ensayo realizado en una microplaca y usando un substrato colorimétrico o fluorimétrico. Así, en condiciones normales, la fosfatasa es capaz de hidrolizar de forma específica un sustrato obteniéndose un producto que puede ser detectado por espectroscopía UV-VIS. En presencia de

toxinas del grupo del OA se producirá una inhibición de la actividad enzimática proporcional a la cantidad de toxina presente en la muestra. Mediante la utilización de una curva de calibrado se pueden obtener los valores de concentración de toxina presentes en la muestra analizada. Este método presenta un límite de detección de aproximadamente 30 µg OA/kg hepatopáncreas y un límite de cuantificación de 85 µg OA/kg hepatopáncreas.

Sin embargo, entre otros muchos métodos alternativos a los bioensayos en animales (ensayos sobre inducción de apoptosis con células vivas, o sobre cambios en potenciales de membrana y flujo de iones con anticuerpos) (**Vilarinho *et al.*, 2010**), uno de los métodos más punteros y eficaces aunque aún en desarrollo, se basa en la construcción de microarrays que revelen la expresión de determinado patrón génico diferencialmente expresado en mejillones contaminados respecto a mejillones control (**McNamee *et al.*, 2014**). Pero esto requiere la identificación previa de una serie de genes presentes en el genoma del mejillón que actúen como bioindicadores de contaminación, lo que requiere conocimientos más detallados sobre el transcriptoma del mejillón. Por ejemplo en el caso de la ostra cuyo genoma ya se encuentra disponible en las bases de datos, se han construido microarrays útiles ante una gran variedad de perturbaciones ambientales (**Jenny *et al.*, 2007**).

## 9. BIOMARCADORES GENÉTICOS DE DETECCIÓN

Como se ha visto hasta el momento, es imprescindible el uso de métodos de control para verificar la presencia de toxinas en los bivalvos previamente a su comercialización. Sin embargo, esto continúa generando enormes pérdidas económicas una vez que los moluscos están contaminados.



Un método factible y en auge desde hace pocos años, enmarcado dentro de los métodos moleculares de detección de toxinas, es el uso de biomarcadores genéticos de contaminación. Un biomarcador se puede definir como la medida a nivel molecular, celular, o del organismo completo, de la exposición a tóxicos (biomarcador de exposición), o de la respuesta de este organismo a los contaminantes (biomarcador de efecto). Su estudio permite identificar las interacciones que han ocurrido entre los contaminantes y los organismos, permitiendo además la evaluación de los efectos subletales, lo cual proporciona una señal de advertencia para iniciar acciones preventivas o paliativas (biorremediación) (Cajaraville *et al.*, 2000; Sarkar *et al.*, 2006; Marigómez *et al.*, 2013). Además, estos efectos subletales son detectados primero a nivel molecular o bioquímico, por lo que el uso de biomarcadores permite evaluar las señales de alerta producidas antes de que ocurran graves efectos en el medio. Actualmente existen *chips* en el mercado que permiten evaluar la exposición a un tóxico, como el “*Expert System*” (Dondero *et al.*, 2006) que permite detectar la respuesta de mejillones a la contaminación por cobre a través de un set de siete biomarcadores, correspondientes con genes relativos a la estabilidad de la membrana lisosomal, a la acumulación de lípidos en los lisosomas, al ratio  $V_{\text{lisosoma}} / V_{\text{citoplasma}}$  o a la actividad catalasa. También se han identificado biomarcadores en mejillón mediante estudios con genes relativos a la actividad glutatión-S-transferasa para evaluar la respuesta en presencia de cadmio y/o benzo-[ $\alpha$ ]pireno (Hoarau *et al.*, 2006).

Es importante señalar que, a pesar del creciente interés en el empleo de moluscos bivalvos como centinelas de contaminación ambiental marina, debido al escaso conocimiento de su genoma, la aplicación de bioindicadores genéticos de contaminación en estas especies está muy limitada. Es por ello cada vez más necesario el estudio del perfil toxicológico de estos organismos para la identificación de genes que sirvan como biomarcadores y posibiliten la

detección temprana de episodios tóxicos en el medio marino. De hecho, el uso de herramientas moleculares para la biomonitorización supondrían un avance en cuanto a que ofrecen una mayor sensibilidad y fiabilidad, una detección temprana y, en la mayoría de los casos, un abaratamiento de los costes.

## **10. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL OA EN LOS MOLUSCOS BIVALVOS**

Como ya se ha indicado, las toxinas DSP, producidas por una gran variedad de especies de dinoflagelados, son las biotoxinas marinas más abundantes en Europa, y concretamente en la costa gallega. La caracterización del efecto que ejerce el OA sobre los moluscos bivalvos, y concretamente los mejillones, es esencial debido a las siguientes razones:

1. Galicia es una región con una importante industria mejillonera desde donde se distribuyen estos productos a numerosos consumidores, y uno de los principales problemas que paraliza esta distribución causando notables pérdidas económicas en el sector es la intoxicación por toxinas como el OA presentes en los *blooms* microalgales;
2. Los mejillones son organismos filtradores por lo que bioacumulan el OA y otras toxinas, pero a pesar de constituir el vector a través del cual la toxina llega al consumo humano generando múltiples síndromes, la presencia de OA no afecta a la viabilidad del mejillón;
3. La legislación actual continúa permitiendo un contenido mínimo de toxinas en vianda, lo cual implica que moluscos con cantidades inferiores al término legal sean introducidos en el mercado y lleguen al consumidor generando posibles efectos subletales aún poco conocidos;
4. Dados los escasos estudios del transcriptoma de mejillón en general y en lo que respecta a su respuesta al OA, el desarrollo de librerías de

cDNA constituye una buena herramienta para la identificación de nuevas secuencias génicas, en este caso, correspondientes a genes implicados en esta respuesta y candidatos a biomarcadores de exposición al OA;

5. Los estudios realizados sobre el mecanismo de acción del OA y sus efectos revelan su papel de inhibición sobre las PPs y, comprobada la relevante función de estas proteínas en la viabilidad celular, el conocimiento de estas secuencias aportaría más datos sobre los efectos a nivel molecular que provocan diversas concentraciones y tiempos de exposición a OA.

El presente trabajo se focalizó en la evaluación de la expresión diferencial de los genes de dos tejidos de *M. galloprovincialis*, branquia y hepatopáncreas, en individuos control respecto a individuos contaminados con OA. Esto permitió perfilar el tipo de respuesta que se genera en los mejillones tras un episodio tóxico con OA, pues cabe recordar que los mejillones parecen ser insensibles a los efectos citotóxicos de la toxina lo que les permite acumular altos niveles de esta toxina durante largos periodos de exposición.

Además, profundizando en uno de los aspectos de esta respuesta al tóxico, se centró el estudio en uno de los principales efectos del OA: la inhibición de las fosfatasas PP1 y PP2A, fenómeno que, dada la viabilidad mantenida de los mejillones en respuesta a este tóxico, debe ante todo ser evitada mediante algún tipo de mecanismo auxiliar o combinación de varios mecanismos en estos organismos.



# OBJETIVOS



Los mejillones son los organismos marinos más estudiados por su interés ecológico, económico y por su papel como bioindicador de contaminación. Sin embargo, todavía son escasos los estudios realizados sobre su respuesta transcriptómica a la presencia de toxinas DSP como el ácido okadaico (OA) en el medio. También, dado el contraste existente entre la documentada inhibición que el OA ejerce sobre las fosfatasa (PPs) y la aparente invulnerabilidad de los bivalvos a la presencia de este tóxico, es de especial interés la caracterización por primera vez de determinadas PPs en mejillón. Para abordar el estudio de esta respuesta generada a varios niveles por el mejillón ante la presencia de OA, se estructuró este trabajo en base a la obtención de los siguientes objetivos:

- 1) Elaboración de **librerías de sustracción** (SSH) de branquia y de hepatopáncreas de *M. galloprovincialis* sometidos a la acción del dinoflagelado *P. lima* productor de OA y posterior análisis informático de los genes sobrerrepresentados según la terminología del *Gene Ontology* para perfilar el tipo de respuesta que se genera en los mejillones tras un episodio tóxico;
- 2) Estudio de la expresión, mediante **PCR-RT**, de los principales genes obtenidos en las genotecas según criterios de abundancia relativa y representación de los principales procesos biológicos para evaluar a tiempo real su respuesta al OA;
- 3) Caracterización de las secuencias nucleotídicas completas de los cDNA extendidos mediante la técnica de **3'–5' RACE-PCR** a partir de los ESTs observados en las genotecas que codifican para alguna subunidad de las proteínas fosfatasas PP1 y PP2A;
- 4) **Simulación *in silico*** del complejo multimérico PP2A a partir de las secuencias obtenidas de sus subunidades en *Mytilus galloprovincialis*, para

localizar la posición de los posibles motivos significativamente diferentes y verificar su posible implicación en la unión con el tóxico OA;

5) **Análisis evolutivo** de las secuencias de las subunidades catalíticas de PP1 y PP2A, para evaluar la presencia de presión evolutiva.



MATERIALES  
Y MÉTODOS



## ● MATERIALES UTILIZADOS:

Los principales materiales empleados en esta investigación han sido los siguientes:

### *Material electrónico*

- |  |   |
|--|---|
| ✓ 2100 Bioanalyzer                             | ✓ Medidor de pH                                     |
| ✓ Agitador                                     | ✓ Microcentrífuga spin                              |
| ✓ Autoclave                                    | ✓ Microondas  |
| ✓ Balanza de precisión                         | ✓ Nevera  |
| ✓ Campana de flujo laminar                     | ✓ Micropipeta electrónica                           |
| ✓ Centrífuga refrigerada                       | ✓ Secuenciador automático ABI 3730                  |
| ✓ Congeladores -20°C y -80°C                   | ✓ Secuenciador masivo Roche 454 GS FLX+ (Life Seq.) |
| ✓ Espectrofotómetro Nanodrop                   | ✓ Termocicladores con gradiente de temperatura      |
| ✓ Estufa                                       | ✓ Transiluminador                                   |
| ✓ Fuente de alimentación para electroforesis   | ✓ Vortex  |
| ✓ LightCycler 480 System<br>Multiwell Plate 96 |   |

### *Reactivos*

- |                              |                                |
|------------------------------|--------------------------------|
| ✓ Ácido acético glacial 100% | ✓ Bactotripton                 |
| ✓ Acetato amónico 3M         | ✓ Bromuro de etidio (10 mg/mL) |
| ✓ Agar bacteriológico        | ✓ Cebadores de diseño propio   |
| ✓ Agarosa D1 LE              | ✓ Cloroformo                   |
| ✓ Agua mQ                    | ✓ Cloruro sódico               |
| ✓ Ampicilina                 | ✓ dNTPs (2.5 mM <i>each</i> )  |
| ✓ Azul de bromofenol         | ✓ EDTA 0.5 M                   |
| ✓ Xilenocianol               | ✓ Etanol al 75% y al 100%      |

- ✓ Extracto de levadura
- ✓ Glicerol Reagent Plus
- ✓ Glucógeno
- ✓ IPTG
- ✓ Isopropanol
- ✓ Magnesio (MgCl<sub>2</sub>)
- ✓ Nitrógeno líquido
- ✓ Tris Base 0.1 M
- ✓ X-Gal

*Kits comerciales*

- ✓ Células competentes YE107 *E. coli* (YEASTERN BIOTECH)
- ✓ Columnas Amicon Microcon-PCR Centrifugal Filter Devices (MILLIPORE)
- ✓ Columnas Chroma Spin (CLONTECH)
- ✓ DNasa I RNasa-free 1 U/μL (FERMENTAS)
- ✓ ER RsaI (INVITROGEN)
- ✓ Kit 3' – 5' RACE (CLONTECH)
- ✓ Kit BigDye Terminator v3.1 (APPLIED BIOSYSTEMS)
- ✓ Kit SMARTer PCR cDNA Synthesis (CLONTECH)
- ✓ Kit SSH-PCR select cDNA Subtraction (CLONTECH)
- ✓ Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (ROCHE)
- ✓ Kit yT&A Cloning Vector (YEASTERN BIOTECH)
- ✓ Marcadores moleculares (ROCHE)
- ✓ SYBR green I dye supermix (ROCHE)
- ✓ Taq *DNA polymerase* para PCR-colonias 5U/μL ROCHE)
- ✓ TaKaRa Taq *DNA polymerase* 5 U/μL (CLONTECH)
- ✓ TRI® Reagent (INVITROGEN)

*Software*

- ✓ BEAST 1.7 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/>)
- ✓ BioEdit (Ibis Biosciences)
- ✓ Blast2GO (BioBam Bioinformatics)
- ✓ ClustalW (EMBL-EBI)

- ✓ DNA assembler v3.1 (Heraclite BioSoft)
- ✓ EGassembler (<http://www.genome.jp/tools/egassembler/>)
- ✓ Geneious R6 (Biomatters Ltd.)
- ✓ HyPhy Package
- ✓ MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/>)
- ✓ PHYRE<sup>2</sup> (Structural Bioinformatics Group)
- ✓ Primer3 (Biotools)
- ✓ qBase+ (Biogazelle)
- ✓ REST 2009 (QIAGEN)
- ✓ Universal Probe Library (Roche Applied Science)

### ● PREPARACIÓN PREVIA DE MEDIOS:

Todas las preparaciones que se presentan a continuación fueron realizadas en campana de flujo laminar para evitar contaminaciones.

#### *Cebadores o primers utilizados*

Los cebadores liofilizados se diluyeron en agua mQ para obtener soluciones stock de 100  $\mu$ M. Para evitar posibles degradaciones tras ciclos de congelación-descongelación, a partir de esta solución stock se hicieron alícuotas de trabajo a 10  $\mu$ M.

#### *Tampón TAE 50x*

En un matraz aforado de 1 L se añadieron: 242 g de Tris base, 51.7 g de ácido acético glacial, y 100 mL de EDTA 0.5 M a pH 8. Se enrasó con agua mQ, se transfirió a botellas de vidrio y se guardaron a temperatura ambiente.

#### *Geles de agarosa*

Los geles de agarosa se prepararon a concentraciones diferentes dependiendo de la finalidad (visualización de fragmentos pequeños de ADN o purificación

de banda). El peso necesario para alcanzar la concentración adecuada de agarosa (D1 LE al 2%) se disolvió en TAE diluido 1x.

Una vez disuelta la solución de agarosa se vertió en el soporte hasta que solidificó y se transfirió el gel a la cubeta de electroforesis, completamente llena con TAE 1x, donde cada pocillo fue cargado con una muestra (6  $\mu$ L/pocillo). Como control de tamaño molecular se utilizó al menos un marcador de peso molecular. Los geles de agarosa se dejaron migrar a un voltaje de 80-100 mV.

#### *Solución de bromuro de etidio (BrEt)*

La visualización de los geles de agarosa se llevó a cabo mediante inmersión durante 20 min en una solución de BrEt (2.5  $\mu$ M). Para prepararla se añadieron 40  $\mu$ L de BrEt a 10 mg/mL en un recipiente adecuado para el tamaño del gel con 400 mL de TAE diluido 1x.

#### *Tampón de carga*

Por cada 10 mL de agua mQ se añadieron 3 mL de glicerol al 40%, 25  $\mu$ L de azul de bromofenol (colorante de migración rápida, similar a un fragmento de 300 pb) y 25  $\mu$ L de azul de xilencianol (colorante de migración lenta, similar a un fragmento de 5 Kb). Para cargar en el gel, se añadió 1  $\mu$ L de tampón de carga por cada 5  $\mu$ L de muestra de ADN.

#### *Medio sólido Luria-Bertani (LB)*

En 200 mL de agua mQ se añadió 1 g de extracto de levadura, 2 g de bacto triptona, 3 g de agar bacteriológico y 2 g de NaCl. Se ajustó a pH 7 y se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min. Antes de que el medio solidifique (aproximadamente cuando alcanza 50°C) se añadieron a la solución 200  $\mu$ L de ampicilina (antibiótico selectivo) concentrada a 100 mg/mL. Se

mezcló bien, y se vertió en placas de Petri. Cuando solidificó se guardaron las placas boca abajo en bolsas y se almacenaron a 4°C.

#### *Solución IPTG 0.1 M*

Se añadieron 48 mg de IPTG (238.31 g/mol) a 2 mL de agua mQ. Se homogenizó bien con el vórtex y se almacenó a -20°C.

#### *Solución X-Gal 0.1 M*

Se disolvieron 20 mg de X-Gal (408.63 g/mol) en 400 µL de N,N-dimetilformamida. Se mezcló adecuadamente, se cubrió el tubo con papel de aluminio para evitar que la luz lo degrade y se congeló a -20°C.

## ● METODOLOGÍA:

### 1. MUESTREO Y EXPOSICIÓN EXPERIMENTAL A *Prorocentrum lima*

Los ejemplares de *Mytilus galloprovincialis* adultos fueron seleccionados en base a su tamaño, de entre 8 y 10 cm. La zona de muestreo elegida para todo el trabajo se corresponde con la playa de Balcovo (Galicia, W 8° 21' 56" N 43° 19' 50"). Los mejillones fueron trasladados al laboratorio en bolsas con agua de mar. Una vez en el laboratorio se depositaron en tanques de 20 L con aireación, en agua marina filtrada y en circuito semiabierto. Para minimizar el período de aclimatación se controlaron las condiciones naturales de fotoperiodo y se mantuvo la temperatura constante a 18°C y la oxigenación al 80%. Tras el período inicial de aclimatación (3-4 días), los ejemplares se separaron en tres grupos: un grupo control y dos grupos tratados. El grupo control se alimentó tres veces al día con las algas *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suecica*, del

mismo modo que se hizo durante la fase de aclimatación. En los grupos tratados la alimentación fue efectuada exclusivamente con el alga productora de OA *Prorocentrum lima*. Al igual que con el grupo control, la alimentación se llevó a cabo tres veces al día. Las concentraciones utilizadas en los grupos tratados fueron 200 células/L y 20000 células/L.

## 2. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE OA POR LC–MS/MS

Los análisis de contenido de OA se llevaron a cabo en cada tejido por separado (branquia y hepatopáncreas) 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-group toxins by LC–MS/MS*", descrito por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea de Biotoxinas Marinas en Agosto de 2009 (<http://aesan.msssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/procedimientos/EU-Harmonised-SOP-LCMS-OA-Version1.pdf>).

Este método se basa en la extracción con metanol del OA libre presente en una muestra de tejido liofilizado y homogeneizado. Los extractos se filtraron y se analizaron directamente mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de espectrometría de masas tándem (LC-MS/MS) operando en modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). Todos los análisis fueron realizados en los Servicios de Apoyo a la Investigación, Unidad Cromatográfica, de la Universidade da Coruña.

## 3. EXTRACCIÓN DE ARN

Se llevó a cabo la disección en frío de branquias y hepatopáncreas para realizar la extracción del ARN total en los dos tejidos. Para ello, branquias y



hepatopáncreas de seis especímenes se pulverizaron en un mortero con la ayuda de nitrógeno líquido. Aproximadamente 50 mg de este pulverizado fueron utilizados para la extracción de ARN mediante el kit TRI® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El protocolo de extracción se detalla a continuación: se añadieron, en tubos Falcon, 8 mL de Trizol por cada 50 mg de pulverizado. Esta mezcla se repartió en tubos *Eppendorf* (1 mL por tubo), añadiéndose a cada uno 1 µL de *Glycogen* (Sigma, Aldrich) para ayudar a la precipitación del ARN. Todas las centrifugaciones se realizaron a 4°C para preservar la integridad del ARN. Así, los tubos *Eppendorf* se centrifugaron a 12000g durante 10 minutos y se pasó el sobrenadante a tubos limpios donde se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 0.2 µL de cloroformo a cada tubo y se agitaron durante 15 segundos seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 12000g durante 15 minutos. Tras la centrifugación se observaron tres fases: una fase roja de fenol-cloroformo, una interfase, y una fase acuosa transparente en la parte superior, la cual contiene el ARN y fue la que se transfirió a tubos limpios.

La precipitación del ARN se llevó a cabo por inversión del tubo tras añadir 0.5 mL de isopropanol a 4°C. Tras dos períodos de incubación, uno a temperatura ambiente de 10 minutos, y otro de 30 minutos en hielo, las muestras se centrifugaron a 12000g durante 10 minutos, para posteriormente descartar el sobrenadante. El *pellet* se lavó añadiendo 1 mL de etanol al 75%. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 13000g durante 7 minutos y el ARN fue resuspendido a temperatura ambiente (2-3 min) en 100 µL de H<sub>2</sub>O mQ libre de RNAsas.

Los tubos con el ARN resuspendido se pasaron a hielo y se procedió a comprobar la calidad y a medir la concentración del ARN extraído. Para ello se empleó el espectrómetro NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific), verificando

que el ratio  $\Delta_{260}/\Delta_{280}$  era mayor de 1.75 (indicador de que el ARN está íntegro). En los casos que se requería una mayor concentración de ARN, éste se precipitó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche añadiendo 0.1 volúmenes de acetato amónico 3 M y 2.5 de alcohol absoluto (Somerville *et al.*, 1989). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12000g durante 15 min y se lavó dos veces el *pellet* con etanol al 75%. Se repitió el paso de centrifugación el *pellet* fue resuspendido en 100  $\mu\text{L}$  de agua mQ. Además, se cuantificó el ARN en cada muestra mediante el espectrómetro NanoDrop<sup>TM</sup> 1000 (Thermo Scientific), y se comprobó la calidad del ARN en términos de posibles degradaciones mediante electroforesis capilar con el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) para verificar su integridad.

#### 4. GENOTECAS DE SUSTRACCIÓN (SSH)

Esta técnica molecular, descrita por Diatchenko *et al.* (1999), combina normalización y sustracción en un único procedimiento ya que primero se iguala la abundancia de cDNA en la población de interés y después se excluyen las secuencias comunes entre la población de interés y la control. Con ello es posible la comparación entre dos poblaciones de cDNA sometidas a tratamientos distintos con OA y la obtención de aquellos transcritos expresados diferencialmente en respuesta a la presencia del tóxico.

Para la construcción de las genotecas de sustracción se requieren dos metodologías moleculares consecutivas. (Hillmann *et al.*, 2009). El primer paso consiste en la síntesis de cDNA de doble cadena (dscDNA) y en la unión de los adaptadores necesarios partiendo de una concentración inicial de 2 ng – 1  $\mu\text{g}$  de ARN total, mientras que en el segundo paso se lleva a cabo la hibridación de los fragmentos apropiados permitiendo la amplificación

exponencial mediante PCR únicamente de las secuencias expresadas diferencialmente.

Para la síntesis de dscDNA se utilizó el kit SMARTer™ PCR cDNA (Clontech, Madrid). Para la síntesis de cDNA de cadena sencilla es necesaria una retrotranscripción previa mediante cebadores oligo-dT con la diana para la enzima de restricción *RsaI* (3' CDS primer IIA). Estos cebadores se unen a la cola poliA de los ARNm permitiendo la retrotranscripción de la hebra completa. En el extremo 5' de los ARNm se une directamente el oligonucleótido proporcionado en el kit (SMARTer oligo IIA) que contiene también la diana para la enzima de restricción *RsaI*, por lo que todos los transcritos resultado de la retrotranscripción llevan ambos extremos iguales con las dianas para *RsaI* incluidas. A continuación se procedió a la polimerización mediante una PCR convencional con un cebador que se une a este oligonucleótido añadido en el extremo 5' del ARNm y retrotranscrito en el extremo 3' del sscDNA (5'PCR IIA) para obtener finalmente dscDNA [ver Figura 12].

Para evitar alcanzar el *plateau* y obtener una representación adecuada de todos los transcritos, se realizó una fase de optimización de los ciclos aplicados en la PCR anterior con el control suplementado en el kit. Tras esto, las distintas poblaciones de dscDNA con extremos iguales y conocidos y con la diana para *RsaI*, se purificaron en columnas Chroma Spin (Clontech, Madrid). Finalmente se llevó a cabo la digestión con la enzima de restricción *RsaI* para obtener fragmentos con extremos cohesivos adecuados para la posterior ligación de los adaptadores, y de nuevo se realizó una purificación en columnas Amicon Microcon-PCR Centrifugal Filter Devices kit (Millipore, Madrid) para eliminar cualquier tipo de contaminante.

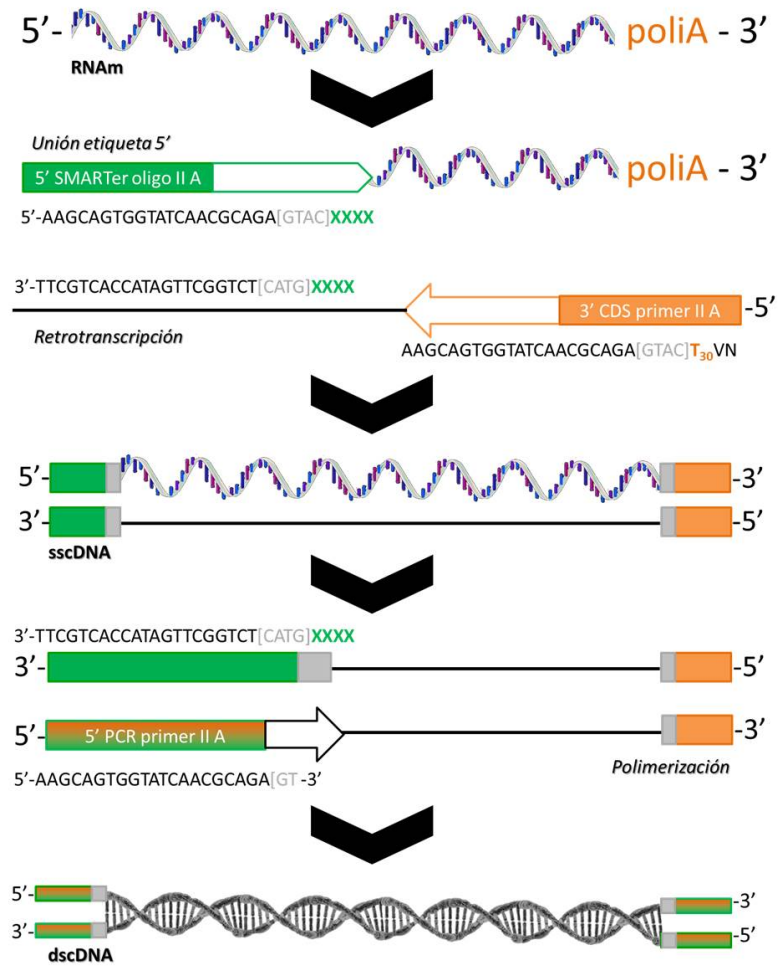


Figura 12. Explicación detallada del mecanismo de adición de etiquetas para la obtención de dscDNA con los extremos 3' y 5' adecuados mediante el kit SMARTer oligo IIA a partir de ARNm. Nótese que en cada etiqueta aparecen en gris las dianas para la ER RsaI. En verde se muestra la etiqueta que se une al extremo 5' del ARN y en naranja la etiqueta que hibrida con la cola poli-A del ARN a partir de la cual se inicia la retrotranscripción para obtener sscDNA. En degradado verde-naranja se muestra el primer que hibrida con la etiqueta verde retrotranscrita a partir de la cual se inicia la polimerización de una hebra de cDNA complementaria para obtener finalmente el dscDNA.

La ligación de los adaptadores necesarios para las hibridaciones adecuadas que pongan de manifiesto los fragmentos diferencialmente expresados, o también llamado **proceso de sustracción**, se llevó a cabo mediante el kit SSH-PCR-select cDNA subtraction (Clontech, Madrid). Las poblaciones de cada dscDNA digerido y purificado se dividieron en tres: una no se sometió a ningún tratamiento (*driver*), y las otras se ligaron con dos adaptadores (*tester*) durante 12 horas a 16°C, una con el *adapter\_1* y otra con el *adapter\_2R*. De esta forma se obtuvieron 3 poblaciones de cada dscDNA procedente de individuos control y tratados con 200 y 20000 células/L.

En la preparación de genotecas de sustracción, dependiendo de la procedencia del ARN del *tester*, individuos control o tratados, se diferencian dos tipos de genotecas: las genotecas *forward* que ponen de manifiesto los fragmentos que aparecen nuevos o que son más expresados en los grupos tratados respecto a los controles (ARN *tester* de individuos tratados), y las genotecas *reverse* que por el contrario revelan aquellos fragmentos que aparecen nuevos o que son más expresados en los grupos control respecto a los tratados (ARN *tester* de individuos control).

Para las genotecas *forward* se realizaron dos hibridaciones consecutivas con estas poblaciones de dscDNA ligadas a adaptadores para obtener finalmente los fragmentos diferencialmente expresados en los grupos tratados. La primera hibridación se realizó entre el *driver* control y un *tester* del respectivo tratado durante 8 horas a 68°C, previamente desnaturalizados a 98°C durante 1 minuto. La segunda hibridación consistió en la mezcla de las primeras hibridaciones realizadas con cada *tester* tratado más el *driver* control desnaturalizado y en exceso. El objetivo final fue obtener los fragmentos diferencialmente expresados del dscDNA del grupo tratado respecto al control con los dos adaptadores ligados.

Por otra parte, para las genotecas *reverse* se realizaron también dos hibridaciones consecutivas con las poblaciones de dscDNA ligadas a adaptadores para obtener finalmente los fragmentos diferencialmente expresados en los grupos control. La primera hibridación se realizó entre el *driver* tratado y un *tester* del respectivo grupo control durante 8 horas a 68°C, previamente desnaturalizados a 98°C durante 1 minuto. La segunda hibridación consistió en la mezcla de las primeras hibridaciones realizadas con cada *tester* control más el *driver* del grupo tratado desnaturalizado y en exceso. El objetivo final fue obtener los fragmentos diferencialmente expresados del dscDNA del grupo control respecto al tratado con los dos adaptadores ligados [ver Figura 13].

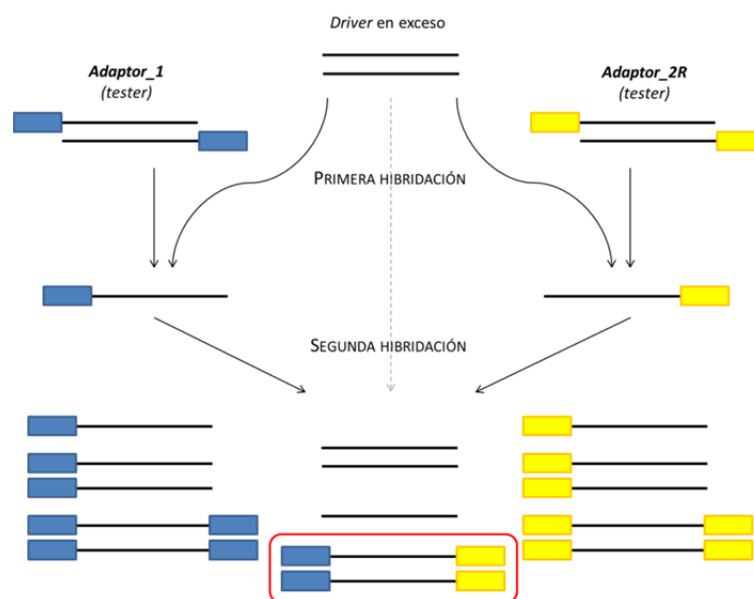


Figura 13. Esquema de las hibridaciones llevadas a cabo con cada una de las poblaciones de dscDNA. En azul se representa el adaptor\_1 y en amarillo el adaptor\_2R. En rojo se señala el híbrido con ambos adaptadores ligados que será el único que contenga la secuencia de cada gen diferencialmente expresado.

Dado el orden de estas hibridaciones se obtuvieron ocho genotecas totales, cuatro de cada tejido estudiado (branquia y hepatopáncreas), y dentro de las cuales se obtuvieron dos *forward* y dos *reverse*. Las *forward* son las genotecas denominadas MBT200/MBC (branquia tratada con 200 células/L), MBT20000/MBC (branquia tratada con 20000 células/L), MGT00/MGC (hepatopáncreas tratado con 200 células/L) y MGT20000/MGC (hepatopáncreas tratado con 20000 células/L). Las *reverse* son las genotecas denominadas MBC/MBT200, MBC/MBT20000, MGC/MGT200 y MGC/MGT20000.

Finalmente, para enriquecer exclusivamente cada muestra tras la segunda hibridación con genes expresados diferencialmente y eliminar el *background*, se realizaron dos PCRs convencionales consecutivas (*nested* PCR) con cebadores complementarios a las secuencias de los dos adaptadores. La primera PCR consistió en una desnaturalización inicial de 25s a 94°C, 27 ciclos de 10s a 94°C seguidos de 30s a 66°C, y una extensión final de 1.5min a 72°C. La segunda PCR consistió en 12 ciclos de 10s a 94°C, 30s a 68°C y 1.5min a 72°C. De esta forma, sólo los híbridos con ambos adaptadores ligados a sus extremos fueron amplificados exponencialmente, desestimando aquellos híbridos y secuencias simples con un único adaptador o sin adaptadores [ver Figura 14].

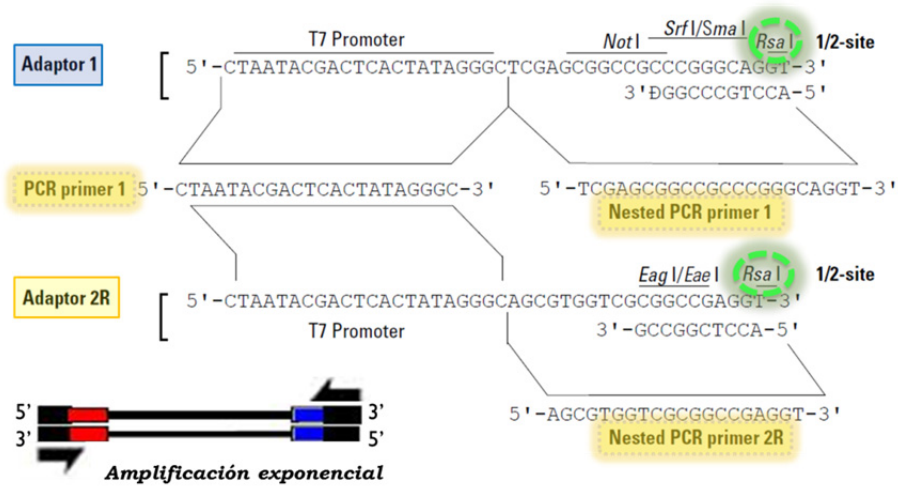


Figura 14. Esquema de las amplificaciones exponenciales llevadas a cabo con primers homólogos a los adaptadores 1 y 2R. Se muestra la secuencia de cada adaptador y los primers incluidos en el kit SSH-PCR-select cDNA subtraction que hibridan sobre ellos.

## 5. LIGACIÓN Y CLONACIÓN

Las ocho genotecas de sustracción obtenidas fueron clonadas por separado en plásmidos yT&A utilizando el kit yT&A Cloning Vector (Yeastern Biotech, Taiwan). La ligación se llevó a cabo durante 20 minutos a temperatura ambiente, y los productos obtenidos fueron transformados en células competentes TE107 de *E. coli* (Yeastern Biotech, Taiwan) tras un choque térmico a 42°C durante 45 s para incrementar la permeabilidad de membrana de las células y ayudar así a que admitan los plásmidos ligados en su interior. Posteriormente las bacterias modificadas fueron cultivadas en placas con medio Luria-Bertani suplementadas con ampicilina, IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido). Esto permitió distinguir a aquellas bacterias que reciben el vector recombinante ya que, dada la presencia del gen de la β-galactosidasa en el sitio de clonación



del vector, la inserción de una secuencia en esta región interrumpe e inactiva este gen impidiendo la metabolización de X-Gal y formando colonias blancas en lugar de azules.

Posteriormente el análisis de las colonias positivas (blancas) se llevó a cabo mediante una PCR convencional utilizando cebadores que hibridan con las regiones que flanquean el sitio de inserción del vector (M13 forward y M13 reverse) suplementados en el kit de clonación. El programa que se utilizó consta de una desnaturalización inicial de 10 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C más 1 min a 55°C más 1 min a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C. Finalmente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para confirmar la presencia de bandas y su tamaño.

## **6. SECUENCIACIÓN CAPILAR CON EL MÉTODO SANGER**

Tanto los fragmentos clonados procedentes de las ocho genotecas como los fragmentos de PPs obtenidos por la técnica 3'-5' RACE que se explicará a continuación, fueron secuenciados por el método enzimático de Sanger en el servicio Secugen (Biological Research Center, Madrid) con un secuenciador automático 3730 de 96 capilares (Applied Biosystems) utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Para ello los insertos fueron diluidos a una concentración de 20 ng/μL con una concentración de cebador de 5 μM (M13 forward o M13 reverse).

Cabe señalar que en el caso de los fragmentos clonados procedentes de las genotecas, sólo los fragmentos mayores de 300 pb fueron secuenciados pues, al margen de que 150 pb se corresponden con secuencia del vector, se pretendió evitar posibles desviaciones debidas a la mayor tendencia de inserción de fragmentos pequeños.

## 7. ANÁLISIS DE SECUENCIAS OBTENIDAS POR SECUENCIACIÓN CAPILAR CON EL MÉTODO SANGER

Todos los cromatogramas obtenidos, en formato ABI, fueron analizados con el software DNA *Baser Sequence Assembler* v3.1 (2010, Heracle BioSoft), tanto para eliminar la secuencia del vector (herramienta VecScreen) como para examinar la calidad de las lecturas en cuanto a tamaño de las secuencias, cantidad de bases no identificadas (N) y presencia de contaminantes. A continuación, los cromatogramas editados se transformaron en formato FASTA generando un archivo por cada genoteca conteniendo todas sus secuencias. Estos archivos se analizaron con el software EGAssembler, que incorpora la herramienta CAP3 (Masoudi-Nejad *et al.*, 2006), necesaria para ensamblar los *contigs* e identificar los *singletons* encontrados por genoteca. Posteriormente estas secuencias se cotejaron con todas las secuencias existentes en las bases de datos (NCBI, EMBL) mediante el software Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005) para asignarles una identidad y agruparlas en alguna categoría funcional. Finalmente, se comprobó si alguna de las categorías GO (Gene Ontology), Procesos Biológicos (BP), Funciones Moleculares (MF) o Componentes Celulares (CC), estaban enriquecidas en alguna de las genotecas. Para ello se llevó a cabo un Fisher's Exact Test (Benjamini *et al.*, 1995) implementado en el software Blast2GO.

## 8. SECUENCIACIÓN MASIVA NGS

Con el objetivo de obtener el máximo número posible de secuencias génicas pertenecientes a una genoteca (“saturación” de genotecas), dos de las genotecas de sustracción obtenidas a partir de cDNA de hepatopáncreas, la genoteca *forward* MGT200/MGC y la *reverse* MGC/MGT200, fueron secuenciadas por medio de un secuenciador masivo Roche 454 GS FLX+ (Roche). La calidad del cDNA necesaria para la preparación de las librerías de secuenciación

requirió una purificación previa mediante el uso de columnas GeneJet (Fermentas, Madrid) para conseguir una concentración de  $\approx 5 \mu\text{g}$  del cDNA de cada genoteca. Del mismo modo que se hizo en el apartado 3 con el ARN extraído, la calidad e integridad del cDNA purificado se evaluó también mediante espectrometría (Nanodrop) y electroforesis capilar (Bioanalyzer).

## 9. ANÁLISIS DE SECUENCIAS OBTENIDAS POR SECUENCIACIÓN MASIVA NGS

Los archivos *sff*, formato de salida del secuenciador Roche, fueron convertidos al formato *fastq* usando la herramienta *sffinfo* del software Newbler (Roche). El primer control de calidad de las secuencias implicó un “*trimming*” de aquellas bases con un *phred score* inferior a 20. Después de realizar el “*trimming*” aquellas secuencias inferiores a 50 pb también fueron eliminadas. A continuación se calculó el número de singletons y secuencias duplicadas, colapsando estas últimas. La distribución de la longitud de las secuencias, la distribución de la calidad de las secuencias, la distribución de calidad por posición de secuencia, así como la distribución de la frecuencia nucleotídica por posición fueron calculadas y visualizadas para comprobar la calidad de las secuencias filtradas. El filtrado de las secuencias se llevó a cabo mediante las herramientas disponibles en el Fastx Toolkit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit)) y la visualización del control de calidad se realizó mediante el empleo del servidor online Galaxy server (<https://usegalaxy.org>). El siguiente paso después del filtrado de las secuencias consistió en la eliminación de adaptadores, tanto los utilizados para la elaboración de las genotecas de substracción como los resultantes de la preparación de las librerías de secuenciación. Para esta tarea se usaron las herramientas *trim\_blast\_short*, disponible en el paquete de herramientas bioinformáticas *seq\_crumbs*

([http://bioinf.comav.upv.es/seq\\_crumbs/](http://bioinf.comav.upv.es/seq_crumbs/)) y el programa *cutadapt*. Los posibles contaminantes (secuencias ribosomales, restos de vectores, etc.) fueron eliminados empleando el programa *filter\_by\_blast* (*seq\_crumbs*) usando una base de datos local de secuencias ribosomales (18S, 28S y 16S) de secuencias de bivalvos, así como vectores de clonación procedentes de la base de datos UniVec.

Las lecturas, una vez filtradas y limpias de adaptadores y contaminantes, fueron ensambladas mediante el software MIRA (<http://sourceforge.net/projects/mira-assembler/>) usando la versión 4.9.3. Los contigs resultantes del ensamblaje fueron comparados contra secuencias disponibles en las bases de datos mediante el empleo de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se emplearon tres grandes bases de datos para hacer la comparación: *GenBank's non-redundant protein database* (NR) y las bases de datos proteicas *Uniprot's Swiss-Prot* y *TrEMBL*. Para considerar una comparación como significativa situamos un valor mínimo de *E-value* = 0.00001. Para la realización del BLAST se utilizó el SVG (Superordenador Virtual Gallego) del CESGA (Centro Supercomputacional de Galicia) (<http://www.cesga.es/>). Aquellas comparaciones que fueron significativas se utilizaron como entrada para una instalación local de Blast2GO (b2g4pipeline) utilizando la base de datos GO con fecha de Noviembre del 2013. Al igual que con las secuencias analizadas mediante secuenciación capilar SANGER, se realizó un análisis de enriquecimiento para términos GO en las dos genotecas analizadas.

## 10. PCR EN TIEMPO REAL (PCR-RT)

Esta técnica de PCR en tiempo real procesa los datos a medida que progresa la reacción de polimerización (PCR) combinando la amplificación y la detección en un único paso, a través del uso de fluoróforos que permiten la correlación

entre la concentración del producto de PCR y la intensidad de fluorescencia (**Higuchi *et al.*, 1993**).

Se seleccionaron para un análisis por PCR-RT aquellas secuencias a las que se les asignaron funciones GO (Gene Ontology, <http://geneontology.org>) relativas al metabolismo, a los procesos de detoxificación o al citoesqueleto, además de aquellas secuencias marcadas como específicas de tratamiento tras la sustracción, para confirmar y cuantificar su expresión diferencial tras el tratamiento con OA.

Los cebadores fueron diseñados mediante la herramienta Universal Probe Library (Roche Applied Science) (<http://lifescience.roche.com/shop/CategoryDisplay?identifiier=Universal+Probe+Library>) con los parámetros por defecto. En la *Tabla 03* se reflejan las secuencias de estos cebadores, su función y las genotecas dónde fueron obtenidas.

Se utilizaron las mismas muestras de ARN empleadas en las genotecas: tanto de branquia (B) como de hepatopáncreas (G), control (C) y tratados (T) durante un día con OA a dos concentraciones distintas, 200 células/L y 20000 células/L (MGC, MBC, MGT200, MBT200, MGT20000, MBT20000).

Cada muestra de ARN fue tratada con DNasa I libre de RNasa (Fermentas, Madrid) para evitar contaminación con posibles restos de ADN. Para ello, a las muestras de ARN se les añadió el volumen correspondiente de 10X Reaction Buffer con MgCl<sub>2</sub> y de DNasa I (1 U/μl) y se incubaron a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo mediante la adición de EDTA 25 mM y posterior incubación a 65°C durante 10 min.

El cDNA se obtuvo mediante retrotranscripción de 1 μg de ARN, previamente tratado con DNasa, en 20 μL totales de mix de reacción y empleando

conjuntamente random primers y oligo-dT. Se utilizó para ello el Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche Applied Science).

CEBADORES PARA PCR-RT	FUNCIÓN	SSH de origen	F/R	SECUENCIAS
<i>Transcription factor API</i>	TARGET DE REFERENCIA	SSH <sub>FOR</sub> MBT200/20000	F/R	5' CCCAATGAAGGTCGATGTAAA 3' 5' CAAGCCTCACACGAAAAGAA 3'
<i>Elongation Factor 2</i>	TARGET DE REFERENCIA	SSH <sub>FOR</sub> MGT200	F/R	ACCACGACGCTTGTGAGA TTCTTGGTAGAAATTCAGTGCCA
<i>Tektin 3</i>	CITOESQUELETO	SSH <sub>FOR</sub> MBT200	F/R	TGTGATAATGTATGCATTGGAATTT ACCATATTATGCAAAGAAACAGAA
<i>Actin</i>	CITOESQUELETO	SSH <sub>FOR</sub> MBT200/20000	F/R	TGCCAACAATGGATAGAAACA GTAAAGCTGGATTTCGAGGA
<i>Gelsolin</i>	CITOESQUELETO	SSH <sub>FOR</sub> MBT200	F/R	GGCGTTTGATTTCTGCTTGT TGTTTAAAGGCTACTTCCATCAA
<i>Dynein light chain</i>	CITOESQUELETO	SSH <sub>FOR</sub> MBT200	F/R	GCTGGTACACCAACATCCAA TGGCTGGATTTCCAACAAT
<i>Tubulin beta chain</i>	CITOESQUELETO	SSH <sub>FOR</sub> MBT200/20000	F/R	GACAACTTTGTTTTCGGACAGA GCACCTCGGTATAATGTCC
<i>Tubulin beta 3</i>	CITOESQUELETO	SSH <sub>FOR</sub> MBT200/20000	F/R	CCGGTGTACCACATGTCT CAGCCAATTTACGGAGATCAG
<i>Cathepsin B</i>	METABOLISMO CELULAR	SSH <sub>FOR</sub> MGT200	F/R	GAAGTCAGAGACCAAGGAGATTG CAGACATAGCTTCTACTGCACCA
<i>Proteasome subunit</i>	METABOLISMO CELULAR	SSH <sub>FOR</sub> MBT200	F/R	GCAACTGATGTTAACCTCCTT AGTGCAGGTTTCGACAGACA
<i>Peroxiredoxin-like</i>	METABOLISMO CELULAR	SSH <sub>FOR</sub> MBT200	F/R	TGCATTTCTGTCAATGATCCA ACATGTGTCTGCCAACATCC
<i>Methionine Sulfox. Reduct.</i>	METABOLISMO CELULAR	SSH <sub>FOR</sub> MBT20000	F/R	TGTGAAGATTTAGGACTTCCACAG CCATATGTTTAAAGCTTATTTGCAGT
<i>Heat Shock Protein 71</i>	ESTRÉS	SSH <sub>FOR</sub> MGT200	F/R	AGGTGGTGGTATGCCAAACT GGTCCACCACTCCACCA
<i>Lectin</i>	SISTEMA INMUNE	SSH <sub>FOR</sub> MGT200/20000	F/R	ATCCTCGTCTGGCTAATCTAT GGTCAGTACCGTATCGGTAA
<i>Trefoil</i>	SISTEMA INMUNE	SSH <sub>FOR</sub> MBT20000	F/R	CCAATCTTCTACTTACTATCT TCGGGCTGCCTACGTACTCGA
<i>F-spondin</i>	DESARROLLO	SSH <sub>FOR</sub> MGT200	F/R	TCAATCCAGCTGTAGTTAAACCAT AGCAACGCCACTATACCAAGA
<i>Suprabasin</i>	DESARROLLO	SSH <sub>FOR</sub> MBT20000	F/R	GGGGCTAGTTATAATCGGTA ATATTCGCTTTAGGGCTGGCG

<i>CYT P450</i>	DETOXIFICACIÓN	SSH <sub>FOR</sub> MGT200/20000	F R	GGCTACGTCTAGCTGTACGTA GTCTGTCCGGTCATTTAGCTGC
<i>CYT like polypeptide 2-</i>	DETOXIFICACIÓN	SSH <sub>FOR</sub> MGT200/20000	F R	GGGGATTGTATACCCCTTGGAAAT GTCGAACGTGGGACCATT
<i>CYT polypeptide 1</i>	DETOXIFICACIÓN	SSH <sub>FOR</sub> MGT200	F R	TCGTTTTCTGCAAATCGTTG TCCATTTGCATATACTCCTTTCG
<i>CYT family 4</i>	DETOXIFICACIÓN	SSH <sub>REV</sub> MBT20000	F R	CCTTGGCTTGGAGAAGGATT TCGTCTGGATCTAGCCCATT
<i>CYT B5 domain</i>	DETOXIFICACIÓN	SSH <sub>REV</sub> MGT20000	F R	TTGCGGAAAATATAAAGGAGATG AATGTGATATGTCGCCACCA
<i>Cytoc. Oxidase subun. III</i>	CADENA RESPIRATORIA	SSH <sub>FOR</sub> MBT200/ MGT200	F R	TAAGGCCCTCGTGTGAGCTA GGGTTTGGCGTACGGATT
<i>Scavenger receptor</i>	BIOMARCADOR POTENCIAL	SSH <sub>REV</sub> MBT20000	F R	TGGAGGTTCTCATTTTGGACA ACGCTTTTCTCGTGACCAGT
<i>Apple mosaic virus</i>	BIOMARCADOR POTENCIAL	SSH <sub>FOR</sub> MGT200	F R	CTTGCAAACATGCAACCAAT CGCAGGAAACGTGAGGTATT

Tabla 03. Cebadores utilizados en PCR-RT y diseñados a partir de los genes secuenciados de las genotecas. También se muestra su función, la genoteca SSH a partir de la que se obtuvo, y la secuencia forward (F) y reverse (R) de cada uno en la orientación adecuada 5' → 3'.

Las amplificaciones por PCR cuantitativa a tiempo real se realizaron en un equipo Light Cycler® 480 Real-Time PCR System Multiwell Plate 96 (Roche Applied Science). La mezcla de reacción se compuso de 10 µL de Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science), 0.8 µL de cada primer a una concentración de 10 µM, 7.2 µL de agua mQ y 2 µL de cDNA. El programa de PCR utilizado consistió de una desnaturalización inicial de 10 min a 95°C, 35 ciclos de 10 s a 95°C más 15 s a 60°C más 10 s a 72°C, seguidos de una curva de melting desde 65 a 95°C con un incremento de 0.5°C cada segundo.

Al finalizar el programa se efectuó el análisis cuantitativo para medir los valores de fluorescencia con respecto al número de ciclos de amplificación, y el

análisis de las curvas de *melting* para verificar la no existencia de dímeros de cebadores así como la presencia de un sólo amplicón.

El número de ciclos de amplificación necesarios para alcanzar el *threshold cycle number* (Ct) fue calculado usando el programa LightCycler software 1.5.0 (Roche Applied Science). Los valores Ct obtenidos fueron utilizados como base para realizar una cuantificación relativa mediante el programa qBase+ (Hellemans *et al.*, 2007) y así poder evaluar su nivel de expresión diferencial. La estabilidad de los genes de referencia o *housekeeping* TF-AP1 y EF-2 seleccionados fue comprobada mediante el programa geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) implementado en el software qBase+.

La evaluación de la significación estadística de la expresión diferencial entre los grupos control y tratados en ambos tejidos se llevó a cabo con el programa REST (*Relative Expression Software Tool*) (<http://www.gene-quantification.de/rest.html>), considerando como diferencias estadísticamente significativas aquellas donde  $p < 0.05$  (Pfaffl *et al.*, 2002).

## 11. DISEÑO DE CEBADORES (NORMALES Y DEGENERADOS)

Para la búsqueda de las distintas subunidades componentes del trímero de la PP2A, se procedió al diseño de cebadores gen-específicos (*gene-specific primers*) y cebadores degenerados. Los primeros se emplearon para la extensión por RACE de secuencias de interés encontradas en las distintas genotecas, mientras que los segundos se utilizaron para la búsqueda de subunidades relacionadas con las fosfatasa que no fueron encontradas en las genotecas.

Los cebadores gen-específicos se diseñaron, en la dirección adecuada, usando como molde la secuencia de interés encontrada en las genotecas, con un tamaño



comprendido entre 23 y 28 nt, con un contenido en GC de 50-70% y con una temperatura de *annealing* mayor a 70°C. Los cebadores diseñados en este trabajo fueron utilizados conjuntamente con los cebadores proporcionados en el kit para 3'-5'RACE, por lo que, además de los parámetros anteriores, se evitó en su diseño cualquier complementariedad con la secuencia de estos cebadores:

*Long Primer para nested – PCR 1 =*

5'-TAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

*Short Primer para nested – PCR 2 = 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'*

Los cebadores degenerados se diseñaron con las mismas características que los anteriores pero usando como molde la secuencia consenso resultado del alineamiento de todas las secuencias obtenidas en las bases de datos del gen de interés. Así, en aquellas posiciones en las que coexistan más de una base se incorporó en el cebador una base degenerada para incrementar la posibilidad de encontrar el gen de interés por PCR.

Ambos tipos de cebadores fueron diseñados mediante la herramienta Primer 3 (Biotools) ajustando los parámetros a los aquí descritos.

## 12. 3'-5' RACE

De entre todas las secuencias obtenidas en las genotecas por secuenciación normal y por secuenciación masiva se localizaron aquellos genes que presentaron homología con cualquier subunidad de las proteínas fosfatasas PP1 y PP2A. Estas secuencias se extendieron aguas arriba y aguas abajo mediante el kit SMARTer RACE 5'/3' (*Kit for Rapid Amplification of cDNA Ends*, Clontech, Madrid) y siguiendo el protocolo desarrollado por **Frohman (1994)**, con el fin de obtener la secuencia completa de cada gen.

La esencia de este método recae en la acción combinada de una reverso transcriptasa y del oligonucleótido SMARTer II A, ambos proporcionados en el kit, ya que una vez culminada la retrotranscripción a partir del cebador oligo(dT), portador de una etiqueta en 5', que se une a la cola 3'- poliA del molde de ARN, cuando la transcriptasa reversa alcanza el otro extremo es capaz de añadir varios residuos a mayores dada su actividad transferasa. Estos residuos sirven como anclaje para la hibridación del oligonucleótido mencionado que proporciona un molde extra para la síntesis de una etiqueta en el extremo 3' del cDNA en formación [ver Figura 15].

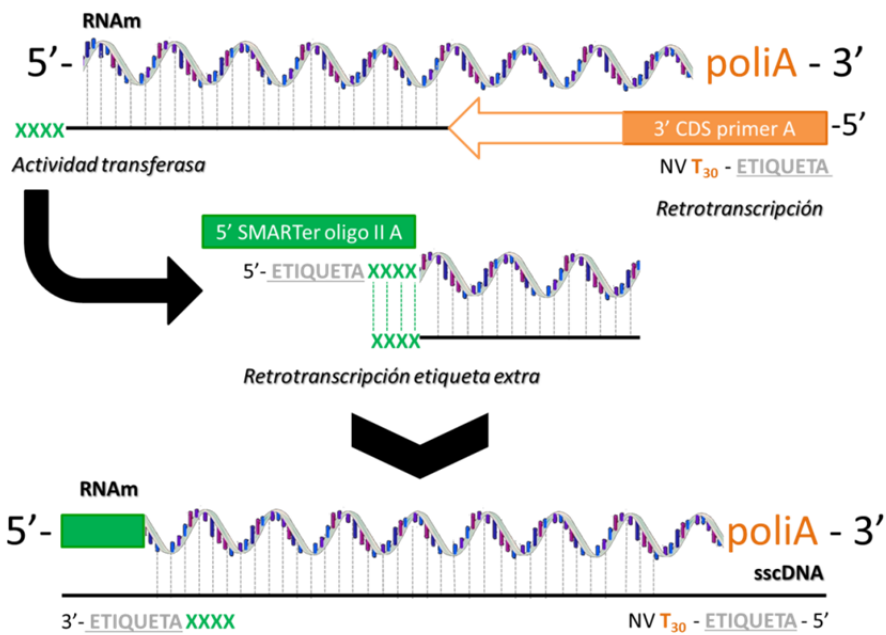


Figura 15. Esquema explicativo del mecanismo del kit SMARTer RACE 5'/3'. Primero ocurre la hibridación de la etiqueta naranja sobre la cola poli-A del ARNm, punto de partida de la retrotranscripción desde el extremo 3', y cuando alcanza el extremo 5' del mismo se añaden varios residuos extra dada la actividad transferasa de la transcriptasa reversa proporcionada en el kit. Después, la etiqueta verde utiliza estos

*residuos como anclaje y permite el inicio de la retrotranscripción, en este caso desde el extremo 5'.*

En la práctica, las reacciones para la adición de ambas etiquetas se realizaron por separado de forma que se obtuvo un cDNA 5'RACE Ready y otro cDNA 3'RACE Ready, teniendo el primero la etiqueta verde en 3' y el segundo la etiqueta naranja en 5' [ver Figura 15].

Para ambas reacciones se preparó un mix común conteniendo 4 µL del buffer proporcionado en el kit, 0.5 µL DTT, 1 µL dNTPs, 0.5 µL RNasa y 2 µL SMARTScribe RT. A continuación se prepararon los mix específicos que se incubaron a 72°C durante 3 min para desnaturalizar el ARN. El mix para la obtención del cDNA 3'RACE Ready contenía 1 µg de ARN poliA bioanalizado más 1 µL del 3'CDS primer A portador de la etiqueta naranja. El mix para la obtención del cDNA 5'RACE Ready contenía 1 µg de ARN poliA bioanalizado más 1 µL del 5'CDS primer A que hibridará con la cola poliA, y tras la incubación se añadió 1 µL del oligonucleótido SMARTer II A portador de la etiqueta verde. Finalmente se mezcló cada mix específico con el mix común y se incubó durante 90 min a 42°C más 10 min a 70°C.

Una vez se obtuvieron los 5' y 3' RACE Ready cDNA se realizaron *nested-PCR* por separado con los cebadores adecuados: los proporcionados en el kit que hibridan sobre las etiquetas, y los diseñados a partir de la región de secuencia conocida del gen de interés, según se aprecia en la *Figura 16*.

Para ello se realizaron dos *touchdown-PCR* consecutivas cuya temperatura de *annealing* disminuye gradualmente con cada mix de reacción, que incluían, en un volumen total de 25 µL, el RACE Ready cDNA diluido adecuadamente, 0.2 µL de Taq polimerasa (Takara), 2.5 µL de buffer correspondiente con Mg<sup>+2</sup>, 2.5 µL de dNTPs y 0.5 µL de cada *primer*. El programa que se utilizó constaba de una fase de desnaturalización inicial de 1 min a 94°C, 15 ciclos de 20 s a 94°C

más 25 s a 68°C más 2 min a 72°C, 10 ciclos más similares donde la temperatura de *annealing* desciende 0.5°C/ciclo (alcanzando en el décimo ciclo los 63°C), y una extensión final de 3 min a 72°C. Los fragmentos resultantes se visualizaron en un gel de agarosa al 2% para verificar sus tamaños, previo a su secuenciación.

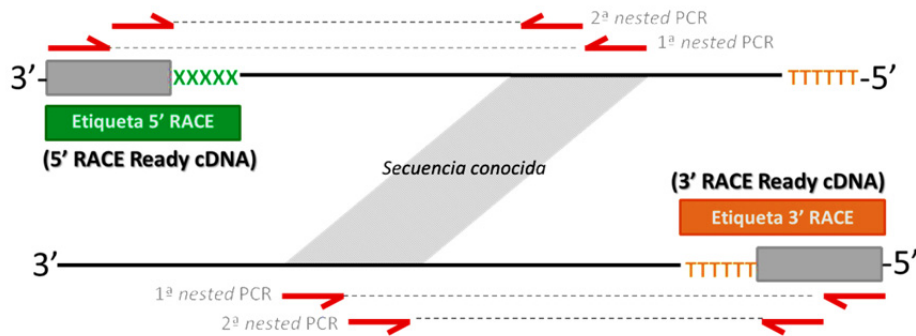


Figura 16. Una vez sintetizados los *sscDNA* con las etiquetas adecuadas en cada extremo, se utilizaron cebadores que hibridan sobre la secuencia conocida del gen de interés (de diseño propio) y cebadores que hibridan sobre la secuencia de las etiquetas añadidas en 3' y 5' para amplificar por PCR los extremos desconocidos de dichos genes. Se realizaron dos PCR consecutivas o *nested* para evitar posibles amplificaciones inespecíficas.

### 13. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE FOSFATASAS (PPS)

Tanto para el diseño de cebadores degenerados como para los análisis evolutivos posteriores de las secuencias de PPs obtenidas, fue necesario realizar búsquedas en la base de datos GenBank (NCBI) de todas las secuencias conocidas codificadoras de subunidades catalíticas de PP1 y PP2A en organismos eucariotas.

Para llevar a cabo la identificación de las diferentes subunidades catalíticas de PP2A se obtuvieron 89 secuencias de subunidades catalíticas que fueron alineadas con el programa MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Se excluyeron del alineamiento aquellas secuencias con una divergencia nucleotídica muy elevada y la región más conservada fue la utilizada para el diseño de los cebadores.

En cuanto a los análisis evolutivos, se seleccionaron 143 secuencias codificantes para la subunidad catalítica de PP1 pertenecientes a 65 especies diferentes, y 118 secuencias de subunidades catalíticas de PP2A pertenecientes a 67 especies diferentes, entre las que se incluyen las 89 secuencias mencionadas anteriormente [ver Tablas Anexas 01 y 02]. Las secuencias fueron editadas manualmente con el software BioEdit (Hall, 1999) restringiendo su longitud a la región *cds* de la proteína antes de realizar los alineamientos múltiples de estas secuencias traducidas a proteínas con el software CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994).

#### 14. EMULACIÓN PROTEICA ESTRUCTURAL DE PP2A

La secuencia obtenida de la subunidad catalítica de PP2A se utilizó para construir una emulación estructural *in silico* mediante el software PHYRE<sup>2</sup> (*Protein Homology analogY Recognition Engine v2.0*). Este programa actúa comparando la secuencia caracterizada en este trabajo con secuencias de PP2A ya conocidas en otras especies y realizando mediante esta guía una estructura tridimensional que simula el plegamiento de nuestra proteína. El objetivo es conocer la posición exacta en el trímero de los motivos variables encontrados en la secuencia aminoacídica de la subunidad catalítica de PP2A encontrada en el mejillón.

## 15. BÚSQUEDA EN BASES DE DATOS DE SECUENCIAS DE PPS

Tras obtener las secuencias completas de los genes seleccionados de las PPs, se analizó su composición nucleotídica y aminoacídica con el software Geneious R6 6.1.6 (Biomatters Ltd.). Respecto a la secuencia nucleotídica de cada ORF, se obtuvieron datos de tamaño, temperatura de *annealing* y contenido CG%. Respecto a la secuencia proteica, se obtuvieron datos también de tamaño, peso molecular y punto isoeléctrico. Finalmente se realizaron análisis evolutivos sencillos con las secuencias nucleotídicas de las subunidades reguladoras de PP2A mediante la herramienta BLAST implementada en la web del NCBI. Los árboles evolutivos para cada secuencia se obtuvieron mediante el método de Kimura (**Kimura, 1980**).

## 16. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE PPS

La filogenia de las subunidades catalíticas de PP1 y PP2A, tanto a nivel de aminoácidos como a nivel de nucleótidos, fue reconstruida según el enfoque probabilístico de Máxima Verosimilitud (“*maximum likelihood*”, ML) utilizando el programa MEGA v. 6 (**Tamura et al., 2013**). Tanto para el caso de PP1 como para el de PP2A, se usó el modelo GTR (*General Time Reversible*) asumiendo estacionariedad, reversibilidad y homogeneidad (**Rodríguez et al., 1990**) a nivel nucleotídico mientras que la matriz de reemplazamiento LG (*Le and Gascuel*) fue la elegida para llevar a cabo el análisis a nivel aminoacídico (**Si Quang et al., 2008**). Al margen de la probabilidad de cambio de nucleótidos y aminoácidos, se añadió también un parámetro adicional para modelar la variación de estas tasas de mutación entre las posiciones del alineamiento descrito mediante una distribución gamma.

El grado de confianza de la topología del árbol reconstruido para PP1 y para PP2A fue contrastado utilizando un test *bootstrap* no paramétrico con 1000 réplicas, y posteriormente fue examinado por análisis bayesianos para obtener una distribución aproximada de las probabilidades posteriores correspondientes utilizando el programa BEAST v. 1.7 (**Drummond et al., 2012**). Para estos análisis bayesianos se utilizó el algoritmo MCMC (*Markov chain Monte Carlo*), mediante el que se evaluaron, tres veces de forma independientes, tres topologías cada 1000 generaciones para asegurar la independencia de los árboles sucesivos, hasta alcanzar las 10000 generaciones. Además, dado que se comienza por una topología aleatoria en las generaciones iniciales (fase de *burn-in*) arrojando así una probabilidad posterior baja, los 1000 primeros árboles fueron descartados.

## 17. ANÁLISIS DE EVOLUCIÓN MOLECULAR Y PRESIÓN EVOLUTIVA DE PPS

Suponiendo que la tasa evolutiva no fuese constante, la huella de la posible presión selectiva presente en las subunidades catalíticas de PP1 y PP2A fue estudiada siguiendo dos enfoques distintos. Por un lado, se analizó la presencia de relojes moleculares locales y globales mediante el software HyPhy (**Pond et al., 2005**). Por otro lado, se examinó la existencia de episodios selectivos de diversificación ( $\omega > 1$ ) a nivel molecular sobre codones particulares de cada gen en determinadas ramas de la filogenia mediante el modelo REL (*Random Effects Likelihood*) (**Pond et al., 2005**).

En total se examinaron 347 codones en la subunidad catalítica de PP1 y 381 codones en la subunidad catalítica de PP2A. La proporción de sitios en los que se infería que actuaba la selección diversificadora en cada rama se estimó utilizando un contraste LTR (*likelihood ratio tests*) basado en la razón de

verosimilitudes, resultando en un p-valor concluyente con los episodios de selección descritos. El coeficiente de selección fue dividido en tres intervalos ( $\omega > 5$ ,  $\omega = 1$ ,  $\omega = 0$ ) por propósitos descriptivos. El estudio de la selección se extendió a sitios individuales utilizando el “*Mixed Effects Model of Evolution*” (MEME), modelando la variable  $\omega$  (dN/dS) a través de las líneas evolutivas y de los sitios individuales (Murrell *et al.*, 2012). Así, un total de 11 codones en PP1 y 3 en PP2A sujetos a episodios significativos de selección diversificadora (p-valor < 0.05) se detectaron con la herramienta MEME y se analizaron posteriormente en el contexto de las filogenias de PP1 y PP2A, proporcionando información en ramas internas de la acumulación de un elevado número de mutaciones no sinónimas. Estos análisis se llevaron a cabo mediante el webserver Datamonkey (Delpont *et al.*, 2010; Poon *et al.*, 2009).



# RESULTADOS



## 1. ESTUDIO DE LAS GENOTECAS SSH SECUENCIADAS POR EL MÉTODO SANGER

En este trabajo se construyeron un total de ocho genotecas de sustracción, cuatro correspondientes a tejido branquial y las otras cuatro a hepatopáncreas. Dentro de cada uno se diferencian dos genotecas *forward* y dos genotecas *reverse* que a su vez se distinguen por el tipo de tratamiento: 200 y 20000 células de *P. lima* por litro [ver Tabla 04].

GENOTECA TEJIDO	Tejido: Branquia (B)	Tejido: Hepatopáncreas (G)
Genoteca: <i>Forward</i>	MBT200/MBC MBT20000/MBC	MGT200/MGC MGT20000/MGC
Genoteca: <i>Reverse</i>	MBC/MBT200 MBC/MBT20000	MGC/MGT200 MGC/MGT20000
<b>TOTAL</b>	<b>4 genotecas de branquia</b>	<b>4 genotecas de hepatopáncreas</b>

Tabla 04. Resumen de todas las genotecas construidas partiendo de ARNm extraído de branquia y hepatopáncreas control y tratados con dos concentraciones de células productoras de OA: 200 células/L y 20000 células/L. MBT y MBC se corresponde a tejido branquial tratado y control respectivamente, mientras que MGT y MGC se corresponden a tejido de hepatopáncreas tratado y control respectivamente.

### 1.1. ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE OA

Es relevante destacar en primer lugar que la exposición al tóxico del hepatopáncreas es considerablemente mayor que la exposición de las branquias ya que el primero es un tejido más activo y está implicado en la purificación y detoxificación de ciertos genotóxicos. En los análisis por LC-MS/MS realizados para cuantificar el OA presente en cada tejido, sólo se detectó presencia significativa del tóxico en branquias de mejillones incubados por más de 3 días, mientras que en hepatopáncreas de mejillones incubados durante un

día ya se cuantificaron 73 ng/g en las muestras tratadas con 200 células/L y 489 ng/g en las tratadas con 20000 células/L.

## 1.2. ANÁLISIS GLOBAL DE LAS GENOTECAS

En total se secuenciaron por secuenciación capilar (Sanger) 1346 clones pertenecientes a las 8 genotecas. Tras el análisis de calidad correspondiente se descartaron 243 clones debido al reducido tamaño de secuencia y/o al elevado número de indeterminaciones, dejando un total de 1103 secuencias para el análisis posterior (580 secuencias en las genotecas *forward* y 523 en las genotecas *reverse*). De ellas, 784 secuencias o ESTs (*expressed sequences tags*) presentaron homología con alguna de las secuencias depositadas en la base de datos GeneBank (nr) [ver Tabla 05].

NÚMERO DE TRANSCRITOS	
Secuencias totales	1346
Transcritos analizados	1103
Transcritos con similitud en BLAST	784
Transcritos desconocidos	319

Tabla 05. Características de las secuencias obtenidas por el método convencional. Se refleja el número de ORFs obtenidos, el número de transcritos descartados por motivos de calidad para análisis posteriores y el número de transcritos sin identidad conocida.

De entre las secuencias que sí presentaron homología con algún gen conocido de otra especie se obtuvieron los datos necesarios para la representación del “*top hit*” de especies con mayor homología [ver Figura 17] y también para la distribución de secuencias según la cobertura de homología a nivel de secuencia alcanzada [ver Figura 18].

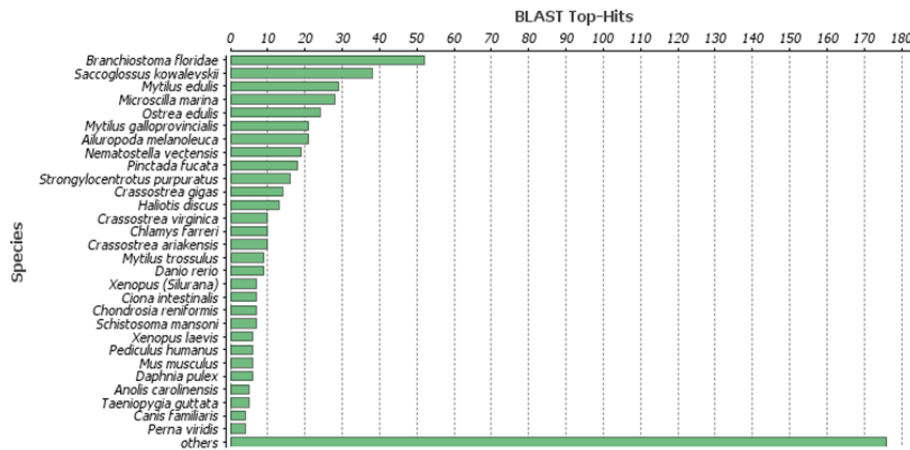


Figura 17. “Top hit” de las especies que presentan mayor homología con las secuencias identificadas en las genotecas SSH de mejillón (*M. galloprovincialis*).

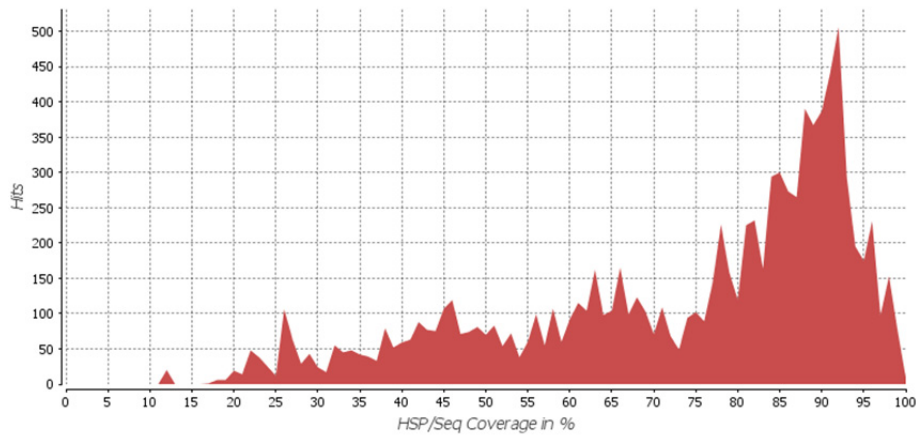


Figura 18. Distribución de las secuencias conocidas de las genotecas SSH según el porcentaje de cobertura a nivel de secuencia que presenta homología con alguna secuencia conocida. Nótese que la mayoría de los hits encontrados ocurren con secuencias con más del 90% de cobertura.

Todas las secuencias fueron ensambladas para determinar el número de *contigs* existentes en cada genoteca y eliminar así la redundancia de ciertas secuencias. En la *Tabla 06* se indican los *contigs* ensamblados en cada genoteca y el número de secuencias a partir de las cuales se realizó el ensamblaje.

GENOTECA	N° SEC.	CONTIGS	SINGLETONS
<b>MBT200/MBC</b> ( <i>forward</i> )	148	16 (56 secuencias)	92
<b>MBT20000/MBC</b> ( <i>forward</i> )	141	18 (60 secuencias)	81
<b>MBC/MBT200</b> ( <i>reverse</i> )	116	13 (35 secuencias)	81
<b>MBC/MBT20000</b> ( <i>reverse</i> )	136	5 (14 secuencias)	122
<b>MGT200/MGC</b> ( <i>forward</i> )	142	6 (33 secuencias)	109
<b>MGT20000/MGC</b> ( <i>forward</i> )	149	8 (30 secuencias)	119
<b>MGC/MGT200</b> ( <i>reverse</i> )	109	5 (18 secuencias)	91
<b>MGC/MGT20000</b> ( <i>reverse</i> )	162	10 (28 secuencias)	134
<b>TOTAL =</b>	<b>1103</b>	<b>81 (274 sec.)</b>	<b>829</b>

Tabla 06. Número de secuencias totales por genoteca, y número de contigs y singletons obtenidos en cada una. En la columna “contigs” se muestra entre paréntesis el número de secuencias exactas que se ensamblaron para obtener los contigs indicados.

Tras la búsqueda de homología en las bases de datos, los ESTs con un *Evalue* < 0.00001 fueron anotados usando la base de datos Gene Ontology (GO; <http://geneontology.org/>). Así, en lo referente a los principales procesos biológicos (BP) implicados en la respuesta del mejillón al OA, tomando en conjunto todas las genotecas, destacaron los siguientes en orden de abundancia: 1) procesos metabólicos (~21%), 2) procesos celulares (~18%), 3) procesos de organismos sencillos (~15%), 4) organización y biogénesis de componentes

celulares (~8%), 5) regulación biológica (~7%), 6) respuesta a estímulos (~6%), 7) localización (~5%), 8) señalización (~3%) y 9) procesos del sistema inmune (~2%). En la *Figura 19* se muestra de forma más detallada esta distribución de procesos biológicos en cada genoteca. Así por ejemplo, comparando las genotecas *forward* y *reverse*, se observa que tras la exposición a OA, aparece una disminución en la expresión de genes relativos a la reproducción, a la regulación biológica, a la locomoción y a los procesos rítmicos principalmente. Por el contrario, aparece un aumento en la expresión de genes relativos a la señalización, a la organización de componentes celulares y a la localización, de forma primordial. Es importante destacar igualmente que existen diferencias notables entre tejidos, las cuales se discutirán más adelante.

Del mismo modo, en lo referente a las principales funciones moleculares (MF) implicadas en la respuesta del mejillón al OA, tomando en conjunto las ocho genotecas, se encontraron las siguientes en orden de abundancia: 1) actividad catalítica (~45%), 2) unión (~35%), 3) actividad relativa a la estructura molecular (~10%), 4) actividad transportadora (~4%), 5) actividad de regulación de enzimas (~2%), y 6) actividad relativa al transporte electrónico (~1%). En la *Figura 20* se muestra más detalladamente la distribución de funciones moleculares en cada genoteca. Cabe destacar que al igual que con los BP, la comparación entre genotecas *forward* y *reverse* relacionadas con la exposición a OA refleja una represión notable de genes con funciones estructurales, de receptores, de factores de transcripción o de actividad antioxidante. Por el contrario aparecen sobrerrepresentadas funciones como actividad catalítica y unión a proteínas. De nuevo es importante subrayar las diferencias existentes entre los resultados obtenidos en ambos tejidos y en los distintos tratamientos.

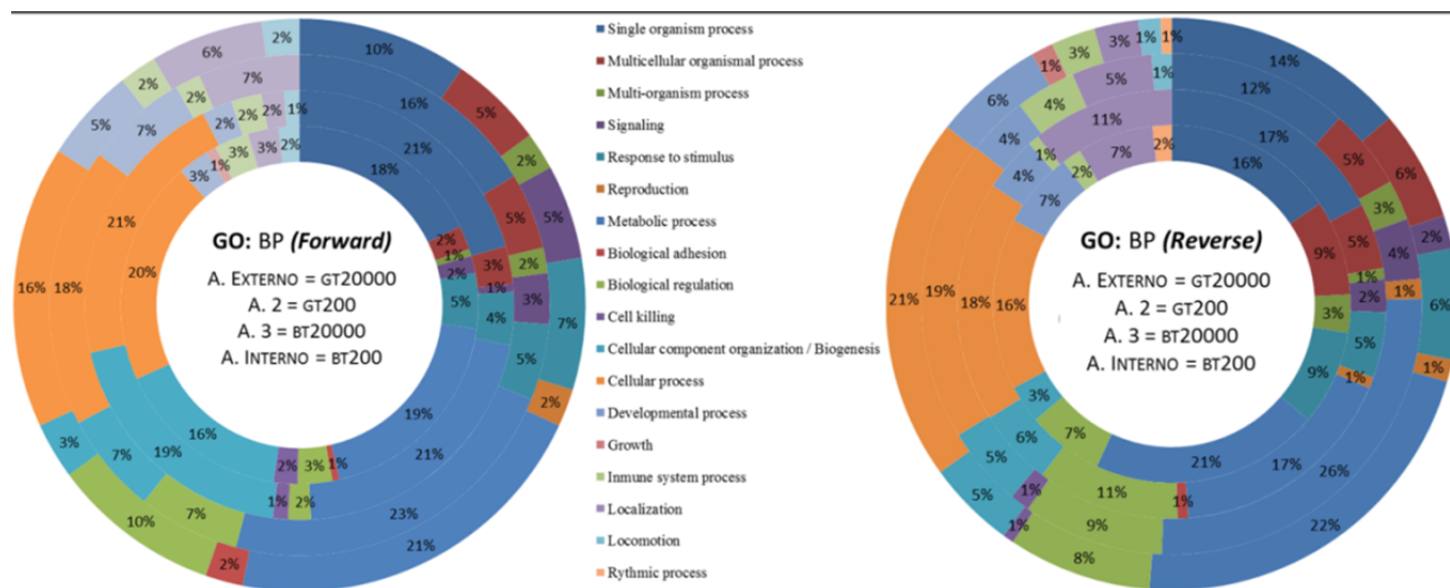


Figura 19. Principales procesos biológicos (BP) en los que se encuentran implicados los genes diferencialmente expresados en las genotecas. A la izquierda se muestra la distribución de los procesos biológicos de primer nivel relativos a las genotecas forward, y a la derecha se muestra la misma distribución para las genotecas reverse. En ambos diagramas circulares, el anillo externo representa la distribución para la genoteca MGT20000, luego MGT200, a continuación MBT20000 y finalmente el anillo interno muestra la distribución para la genotecas MBT200.



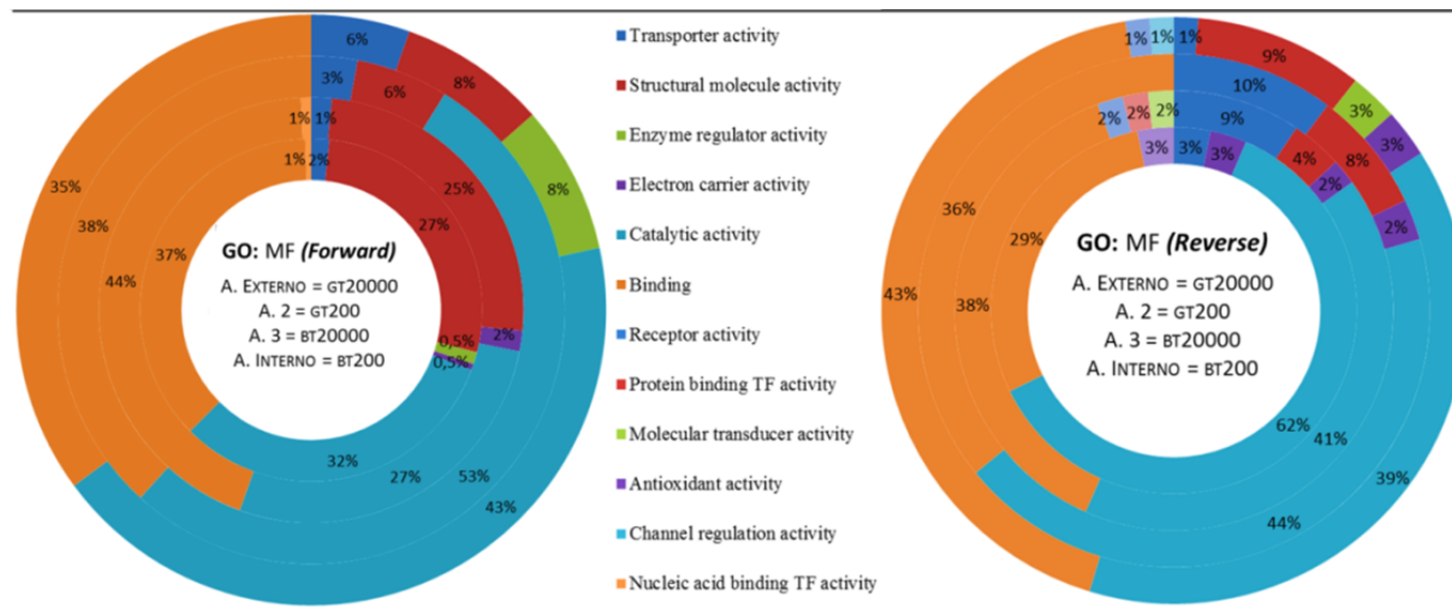


Figura 20: Principales funciones moleculares (MF) en los que se encuentran implicados los genes diferencialmente expresados en las genotecas. A la izquierda se muestra la distribución de las funciones moleculares de primer nivel relativos a las genotecas forward, y a la derecha se muestra la misma distribución para las genotecas reverse. En ambos diagramas, el anillo externo representa la distribución para la genoteca MGT20000, luego MGT200, a continuación MBT20000 y finalmente el anillo interno muestra la distribución para la genotecas MBT200.

### 1.3. ANÁLISIS DE LAS GENOTECAS DE BRANQUIA

De forma más específica, en lo referente a las genotecas procedentes de branquia, se obtuvieron 289 secuencias correspondientes a las genotecas *forward* y 252 a las *reverse*. El total de homología con secuencias conocidas fue de un 78.55%. Entre los genes relacionados con el tratamiento de 200 células/L (procedentes de las genotecas MBC/MBT200 y MBT200/MBC), y a nivel de MF, se encontraron sobrerrepresentados aquellos relativos a la actividad GTPasa, la unión a proteínas y con constituyentes estructurales del citoesqueleto. Sin embargo, el número de secuencias relacionadas con la actividad carbono-carbono liasa fue significativamente inferior. Por otro lado, entre los BP, se apreció un enriquecimiento en procesos relacionados con la polimerización de proteínas, el movimiento basado en los microtúbulos, la inducción de apoptosis y los procesos del ciclo celular. En este caso la represión fue identificada en aquellos genes relativos al comportamiento y a los procesos multiorgánicos. Finalmente, entre los componentes celulares sobreexpresados se identificaron genes relativos a la parte citosólica y a los microtúbulos. Algo similar ocurre con los genes alterados por el tratamiento de 20000 células/L (procedentes de las genotecas MBC/MBT20000 y MBT20000/MBC), pero en este caso aparecen como sobreexpresadas la actividad ATP entre las funciones moleculares, la organización del citoesqueleto y los procesos de biosíntesis de auxinas entre los procesos biológicos, y la fracción soluble y el citoesqueleto cortical entre los componentes celulares. Todo esto en detrimento de otros genes reprimidos con funciones relativas a la inducción de apoptosis y a los procesos del ciclo celular, a los procesos metabólicos e inmunológicos como proteólisis, metabolismo de lípidos, transporte mediado por vesículas y respuesta celular a estímulos, y a funciones como la unión de iones metálicos o actividad oxirreductasa.

En la *Tabla 07* se expone con más detalle el conjunto de términos GO sobrerrepresentados y reprimidos en las genotecas de branquia tras los tratamientos con 200 y 20000 células/L.

Término GO	Categ.	P-Value	AN Test	AN Ref	NoA Test	NoA Ref	Efecto
<b>MBT 200</b>							
GO:0005874 <i>Microtubule</i>	CC	6.65E-10	46	0	32	31	<b>Over</b>
GO:0005887 <i>Integral component of plasma membrane</i>	CC	0.00566	0	4	78	27	<b>Under</b>
GO:0005829 <i>Cytosol</i>	CC	0.02075	17	1	61	30	<b>Over</b>
GO:0005794 <i>Golgi apparatus</i>	CC	0.02141	0	3	78	28	<b>Under</b>
GO:0005525 <i>GTP binding</i>	MF	2.50E-09	44	0	34	31	<b>Over</b>
GO:0003924 <i>GTPase activity</i>	MF	2.19E-08	41	0	37	31	<b>Over</b>
GO:0005515 <i>protein binding</i>	MF	0.00305	50	10	28	21	<b>Over</b>
GO:0016830 <i>carbon-carbon lyase activity</i>	MF	0.02141	0	3	78	28	<b>Under</b>
GO:0005200 <i>structural constituent of cytoskeleton</i>	MF	0.03178	11	0	67	31	<b>Over</b>
GO:0051258 <i>protein polymerization</i>	BP	2.50E-09	44	0	34	31	<b>Over</b>
GO:0007018 <i>microtubule-based movement</i>	BP	2.50E-09	44	0	34	31	<b>Over</b>
GO:0007610 <i>Behavior</i>	BP	0.00145	0	5	78	26	<b>Under</b>
GO:0051270 <i>Regulation of cellular component movement</i>	BP	0.01798	12	0	66	31	<b>Over</b>
GO:0051704 <i>Multi-organism process</i>	BP	0.02246	1	4	77	27	<b>Under</b>
GO:0006915 <i>Apoptosis process</i>	BP	0.03178	11	0	67	31	<b>Over</b>
GO:0022402 <i>Cell cycle process</i>	BP	0.03178	11	0	67	31	<b>Over</b>
GO:0000226 <i>Microtubule cytoskeleton organization</i>	BP	0.03178	11	0	67	31	<b>Over</b>
<b>MBT 20000</b>							

GO:0005625 <i>Soluble fraction</i>	CC	1.00E-05	18	0	56	46	Over
GO:0030863 <i>Cortical cytoskeleton</i>	CC	2.10E-04	17	0	57	46	Over
GO:0070688 <i>MLL5-L complex</i>	CC	8.50E-04	14	0	60	46	Over
GO:0035267 <i>NuA4 histone acetyltransferase complex</i>	CC	8.50E-04	14	0	60	46	Over
GO:0005829 <i>Cytosol</i>	CC	0.00104	26	4	48	42	Over
GO:0012505 <i>Endomembrane system</i>	CC	0.01987	0	4	74	42	Under
GO:0044425 <i>Membrane part</i>	CC	0.02254	5	10	69	36	Under
GO:0005881 <i>Cytoplasmic microtubule</i>	CC	0.04280	7	0	67	46	Over
GO:0003924 <i>GTPase activity</i>	MF	7.68E-07	30	1	44	45	Over
GO:0005525 <i>GTP binding</i>	MF	7.68E-07	30	1	44	45	Over
GO:0005524 <i>ATP binding</i>	MF	4.99E-05	26	2	48	44	Over
GO:0050998 <i>Nitric-oxide synthase binding</i>	MF	8.50E-04	14	0	60	46	Over
GO:0019894 <i>Kinesin binding</i>	MF	8.50E-04	14	0	60	46	Over
GO:0004197 <i>Cysteine-type endopeptidase activity</i>	MF	0.01986	0	4	74	42	Under
GO:0005200 <i>Structural constituent of cytoskeleton</i>	MF	0.02296	8	0	66	46	Over
GO:0046872 <i>Metal ion binding</i>	MF	0.02634	2	7	72	39	Under
GO:0016491 <i>Oxidoreductase activity</i>	MF	0.03066	4	9	70	37	Under
GO:0051258 <i>Protein polymerization</i>	BP	7.67E-07	30	1	44	45	Over
GO:0007018 <i>Microtubule-based movement</i>	BP	7.67E-07	30	1	44	45	Over
GO:0009851 <i>Auxin biosynthetic process</i>	BP	1.66E-04	21	1	53	45	Over
GO:0006508 <i>Proteolysis</i>	BP	9.00E-04	0	7	74	39	Under
GO:0007010 <i>Cytoskeleton organization</i>	BP	0.01252	9	0	65	46	Over
GO:0006629 <i>Lipid metabolic process</i>	BP	0.01987	0	4	74	42	Under
GO:0051716 <i>Cellular response to stimulus</i>	BP	0.01987	0	4	74	42	Under
GO:0016192 <i>Vesicle-mediated transport</i>	BP	0.01987	0	4	74	42	Under
GO:0033036 <i>Macromolecule localization</i>	BP	0.01987	0	4	74	42	Under

Tabla 07. La tabla muestra los términos de Gene Ontology que se encuentran enriquecidos en el “Test group” (branquia de mejillones tratados con OA) tras compararlo con el “Reference group” (branquia de mejillones control) mediante el Test Exacto de Fisher con corrección FDR. La segunda columna muestra la categoría a la que pertenece cada término GO: **CC** o componentes celulares, **BP** o procesos biológicos, y **MF** o funciones moleculares. Las columnas tercera y cuarta muestran los P-valor obtenidos con el test corregido y no corregido con FDR. Las columnas 5-8 indican el número de secuencias anotadas (AN) y no anotadas (NoA) presentes en el “Test group” y en el “Reference group” que presentan relación con cada término GO. La última columna muestra la presencia de efectos de sobreexpresión (*over*) o represión (*under*) en cada término GO.

#### 1.4. ANÁLISIS DE LAS GENOTECAS DE HEPATOPÁNCREAS

Del mismo modo, en lo referente a las genotecas procedentes de hepatopáncreas, se obtuvieron 291 secuencias de las genotecas *forward* y 271 de las *reverse*, asumiendo que sólo un 63.88% de los genes presentaron homología con otros ya conocidos. Entre los genes relativos al tratamiento de 200 células/L (procedentes de las genotecas MGC/MGT200 Y MGT200/MGC) se encontró principalmente una rápida represión de la actividad transportadora, tanto de sustratos como de electrones, que ocurre a expensas de una elevada sobreexpresión en la actividad catalítica. También entre los procesos biológicos se observó una sobreexpresión de aquellos relacionados con el desarrollo, con el sistema inmune, con la respuesta a estímulos y con la organización de los componentes celulares. De forma similar, entre los genes alterados por el tratamiento de 20000 células/L (procedentes de las genotecas MGC/MGT20000 y MGT20000/MGC) se encontró en este caso, una sobreexpresión de la actividad transportadora de sustratos, catalítica y de regulación enzimática, mientras que se reprime la unión a sustratos. Entre los

procesos celulares se detectó una sobreexpresión en la adhesión biológica, en la regulación biológica, en la localización y en los procesos celulares.

En la *Tabla 08* se expone con más detalle el conjunto de términos GO sobreexpresados y reprimidos en las genotecas de hepatopáncreas tras los tratamientos con 200 y 20000 células/L.

Término GO	Categ.	P-Value	AN Test	AN Ref	NoA Test	NoA Ref	Efecto
<b>MGT 200</b>							
GO:0044444 <i>Cytoplasmic part</i>	CC	0.00959	6	16	19	9	<b>Under</b>
GO:0005737 <i>Cytoplasm</i>	CC	0.04500	10	18	15	7	<b>Under</b>
GO:0065007 <i>Biological regulation</i>	BP	0.03742	2	9	23	16	<b>Under</b>
<b>MGT 20000</b>							
GO:0005829 <i>Cytosol</i>	CC	0.02430	1	10	34	41	<b>Under</b>
GO:0005622 <i>Intracellular</i>	CC	0.02577	15	35	20	16	<b>Under</b>
GO:0044424 <i>Intracellular part</i>	CC	0.02577	15	35	20	16	<b>Under</b>
GO:0005737 <i>Cytoplasm</i>	CC	0.04685	11	28	24	23	<b>Under</b>
GO:0000166 <i>Nucleotide binding</i>	MF	0.01216	4	19	31	32	<b>Under</b>
GO:0032553 <i>Ribonucleotide binding</i>	MF	0.02938	3	15	32	36	<b>Under</b>
GO:0017076 <i>Purine nucleotide binding</i>	MF	0.02938	3	15	32	36	<b>Under</b>
GO:0032555 <i>Purine ribonucleotide binding</i>	MF	0.02938	3	15	32	36	<b>Under</b>
GO:0044092 <i>Negative regulation of molecular function</i>	BP	0.02465	4	0	31	51	<b>Over</b>

*Tabla 08.* La tabla muestra los términos de Gene Ontology que se encuentran enriquecidos en el "Test group" (hepatopáncreas de mejillones tratados con OA) tras compararlo con el "Reference group" (hepatopáncreas de mejillones control) mediante el Test Exacto de Fisher con corrección FDR. La segunda columna muestra la categoría a la que pertenece cada término GO: **CC** o componentes celulares, **BP** o

procesos biológicos, y MF o funciones moleculares. Las columnas tercera y cuarta muestran los P-valor obtenidos con el test corregido y no corregido con FDR. Las columnas 5-8 indican el número de secuencias anotadas (AN) y no anotadas (NoA) presentes en el "Test group" y en el "Reference group" que presentan relación con cada término GO. La última columna muestra la presencia de efectos de sobreexpresión (*over*) o represión (*under*) en cada término GO.

## 2. ESTUDIO DE LAS GENOTECAS SSH SECUENCIADAS POR SECUENCIACIÓN MASIVA NGS

Tanto la genoteca *forward* como la *reverse* de hepatopáncreas que muestran los genes diferencialmente expresados entre controles y el tratamiento leve con 200 células/L fueron ultrasecuenciadas con el objetivo de saturar las genotecas.

En conjunto, y tras los controles de calidad pertinentes, se obtuvieron 774328 lecturas entre las genotecas *forward* y *reverse*. Estas secuencias fueron ensambladas posteriormente hasta obtener un total de 55028 *contigs* que fueron analizados en BLAST. Así, un 44.35% de los transcritos no presentaron homología con ninguna secuencia depositada en las bases de datos GeneBank mientras que sólo un 55.65% de todos los transcritos presentaron homología con alguna de las proteínas conocidas [ver Tabla 09].

Posteriormente, del mismo modo que con las secuencias obtenidas por secuenciación Sanger convencional, se clasificaron los genes obtenidos en términos de las categorías de la base de datos Gene Ontology (GO). En concreto, se clasificaron según los procesos biológicos (BP) y las funciones moleculares (MF) implicadas y se efectuó una comparación entre los resultados obtenidos con la genoteca *forward* y con la *reverse*.

	MGT200/MGC <b>(forward)</b>	MGC/MGT200 <b>(reverse)</b>
<b>Número de lecturas</b>	407957	395582
<b>Secuencias válidas</b>	397614	376714
<b>Contigs</b>	21591	33437
<b>Secuencias desconocidas</b>	9578 (44.36%)	14824 (44.33%)

Tabla 09. Resumen de las características de las secuencias obtenidas por secuenciación masiva. Se representa el número de lecturas totales obtenidas en cada genoteca, el número de secuencias válidas tras desechar aquellas de baja calidad, el número de contigs obtenidos tras el ensamblaje, y el número y porcentaje de secuencias desconocidas tras los análisis de BLAST.

En el caso de la comparativa entre la genoteca *forward* y la *reverse* respecto a los procesos biológicos (BP) [ver Figura 21], y concordante con los datos obtenidos con secuenciación convencional, los procesos mayoritarios continúan siendo la señalización y los procesos celulares.

Sin embargo, tras el tratamiento con OA, se observa una notable represión en procesos que implican un único organismo (*single organism process*), en la respuesta a estímulos y en la señalización, mientras que se aprecia una sobreexpresión en los procesos multicelulares, en los procesos rítmicos y en los procesos relativos a la reproducción [ver Figura 21].



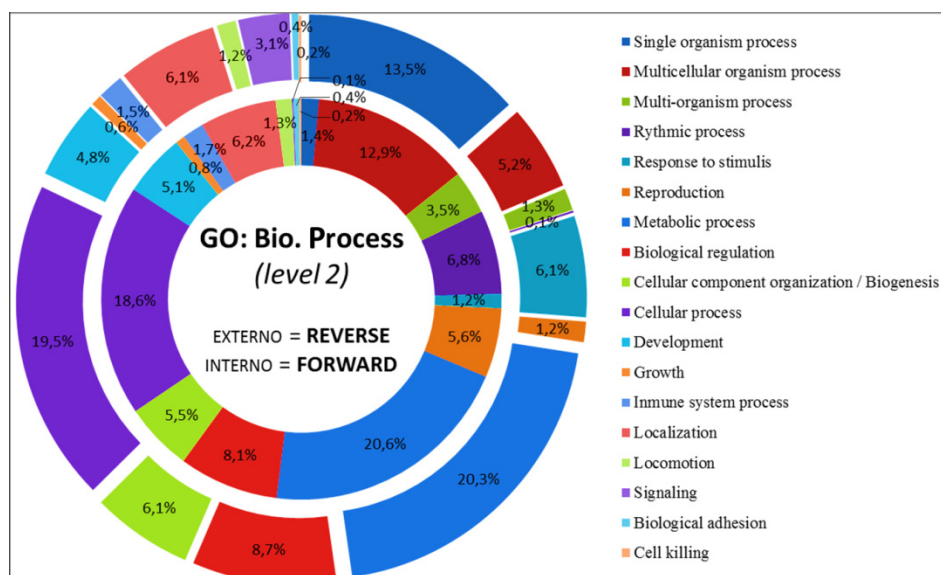


Figura 21. Principales procesos biológicos (BP) en los que se encuentran implicados los genes diferencialmente expresados en las genotecas. El anillo externo se corresponde con la genoteca MGC/MGT200 o genoteca reverse, y el anillo interno con la genoteca MGT200/MGC o genoteca forward.

En el caso de la comparativa entre funciones moleculares (MF), y de nuevo concordante con los datos obtenidos por secuenciación convencional, los procesos mayoritarios continúan siendo la actividad catalítica y la actividad de unión a sustratos. Por otro lado, tras el tratamiento con OA, se observa una represión en la actividad estructural (*structural molecular activity*), mientras que se aprecia una ligera sobreexpresión de la regulación enzimática y de la actividad transportadora. En la Figura 22 se muestra un esquema representativo de esta comparativa respecto a las funciones moleculares con más detalle.

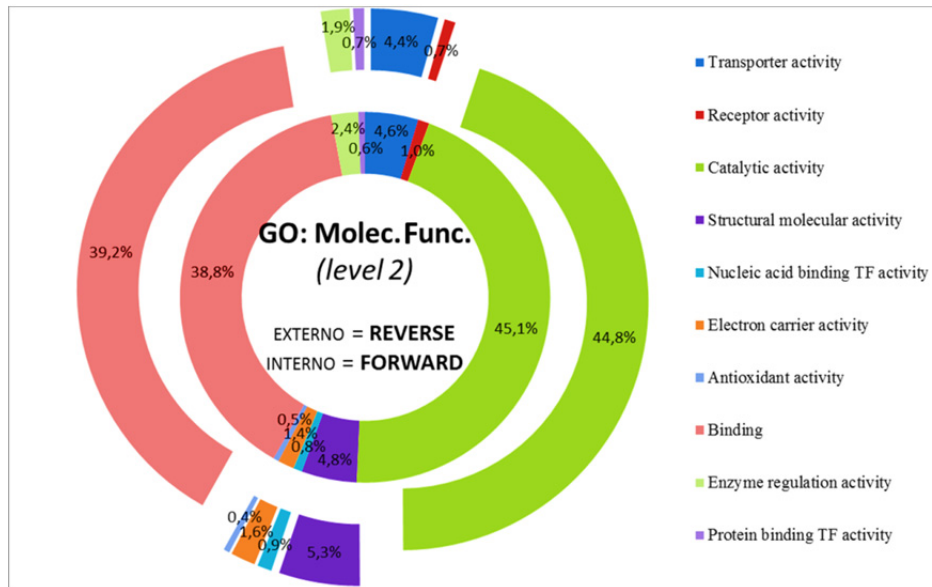


Figura 22. Principales funciones moleculares (MF) en los que se encuentran implicados los genes diferencialmente expresados en las genotecas. El anillo externo se corresponde con la genoteca MGC/MGT200 o genoteca reverse, y el anillo interno con la genoteca MGT200/MGC o genoteca forward.

### 3. ESTUDIO TEMPORAL DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE INTERÉS SELECCIONADOS A PARTIR DE LAS GENOTECAS

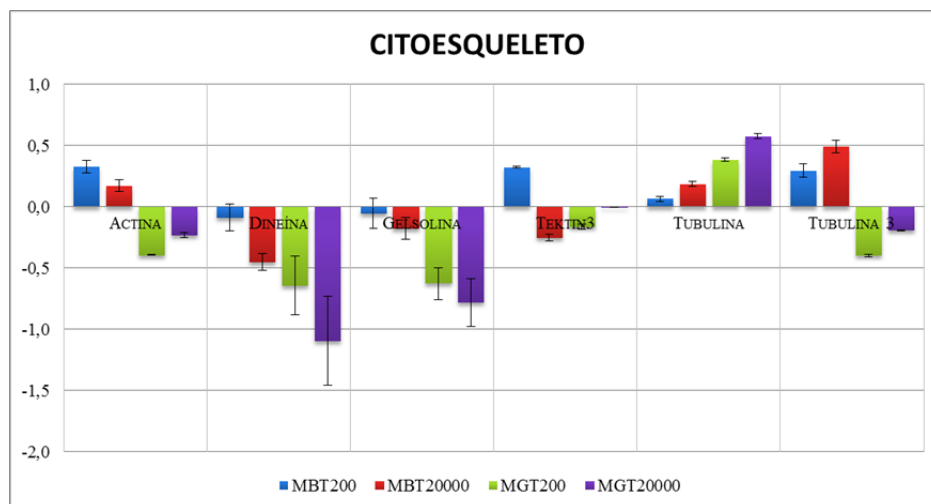
Los 22 genes procedentes de las genotecas SSH que fueron seleccionados para un posterior análisis por PCR-RT se agruparon en 6 categorías: 1) citoesqueleto, 2) metabolismo de compuestos exógenos, 3) metabolismo celular, 4) sistema inmune y estrés, 5) desarrollo, y 6) biomarcadores posibles de contaminación.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los genes asignados a las categorías establecidas.

### 3.1. CITOESQUELETO

Se analizó la expresión de un total de 6 genes: la actina (ACT), la dineína (DYNLL), la tektin3 (TEKT3), la gelsolina (GSN), la tubulin beta chain (TUBB) y la tubulin 3 (TUBB3).

Los resultados obtenidos mostraron una tendencia a la sobreexpresión en uno de los genes relativos a la tubulina beta (*tubulin beta chain*), en todos los tejidos y tratamientos. También se detectó la sobreexpresión de tektin3 y actina a bajas dosis de OA (200 células/L) en branquia. En hepatopáncreas además se reveló una notable propensión a la represión de actina, dineína y gelsolina [ver *Figura 23*].



*Figura 23. Datos logarítmicos de expresión de seis genes, relacionados con el citoesqueleto, analizados por PCR-RT en branquias (MBT) y hepatopáncreas (MGT) de mejillones incubados durante un día con 200 y 20000 células/L de *P. lima*. Se muestran los datos de dos pools de cDNA (1.1 y 2.2).*

### 3.2. METABOLISMO DE COMPUESTOS EXÓGENOS

Se analizó la expresión de 5 genes de la familia de hemoproteínas denominadas citocromo P-450 (CYT P-450). Los resultados obtenidos apuntaron a una tendencia a la sobreexpresión de los niveles de CYT-1 en todos los tratamientos en hepatopáncreas. Los genes CYT-2 y CYT-4 sólo se sobreexpresaron tras elevadas dosis de OA en hepatopáncreas, y a bajas dosis en branquia. Sin embargo, CYT-B5, proteína encargada de facilitar la transferencia de electrones desde el NADPH a otros citocromos, permanecía reprimida en todos los tratamientos para ambos tejidos.

Además se estudió la expresión del gen citocromo oxidasa III (CO III). Los resultados revelaron una tendencia a la sobreexpresión de los niveles de CO III con tratamientos severos (20000 células/L) en hepatopáncreas [ver Figura 24].

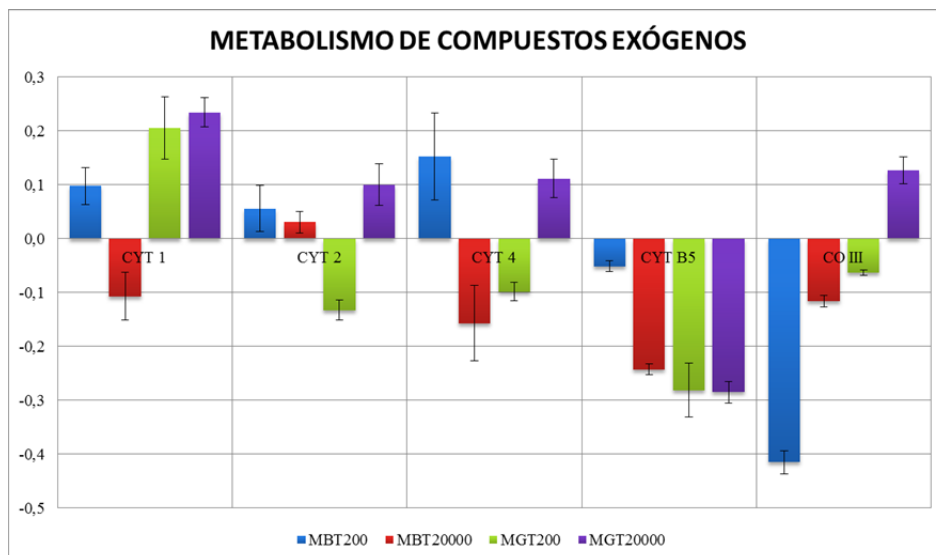
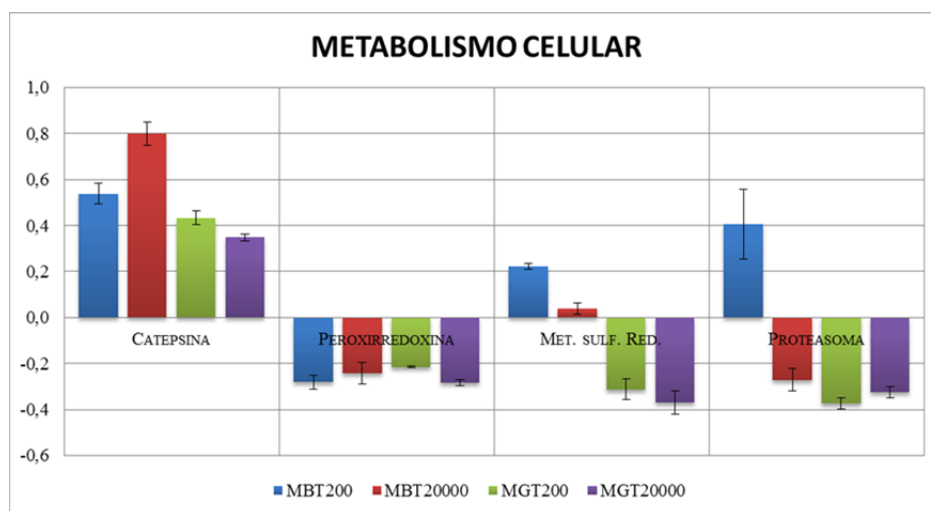


Figura 24. Datos logarítmicos de expresión de cinco genes, relacionados con el metabolismo de compuestos exógenos, analizados por PCR-RT en branquias (MBT) y hepatopáncreas (MGT) de mejillones incubados durante un día con 200 y 20000 células/L de *P. lima*. Se muestran los datos de dos pools de cDNA (1.1 y 2.2).

### 3.3. METABOLISMO CELULAR

Se efectuó el análisis de la expresión de los siguientes 4 genes: el proteasoma (PSM), la catepsina B (CTSB), la peroxirredoxina (PRDX), y la metionina-sulfóxido reductasa (MSR).

Los resultados obtenidos mostraron una leve tendencia a la sobreexpresión de los genes del proteasoma y de la metionina-sulfóxido reductasa a bajas dosis de OA (200 células/L) en branquias, mientras que la catepsina B apareció significativamente sobreexpresada en todos los tratamientos y tejidos [ver *Figura 25*].



*Figura 25. Datos logarítmicos de expresión de cuatro genes, relacionados con el metabolismo celular, analizados por PCR-RT en branquias (MBT) y hepatopáncreas (MGT) de mejillones incubados durante un día con 200 y 20000 células/L de P. lima. Se muestran los datos de dos pools de cDNA (1.1 y 2.2).*

Por el contrario, las peroxirredoxinas aparecieron reprimidas en todos los tratamientos y tejidos [ver *Figura 25*].

### 3.4. SISTEMA INMUNE Y ESTRÉS

Se analizó la expresión de los siguientes 3 genes: proteína de choque térmico 71 (*heat shock protein 71* o HSP71), factor trefoil (TFF) o proteína altamente conservada implicada en procesos de morfogénesis y reparación tisular, y lectinas de unión al ácido siálico (SIGLEC) o proteínas involucradas en la recepción de virus, hormonas y toxinas en invertebrados.

Los resultados obtenidos revelaban una tendencia a la represión en todos los tejidos y tratamiento de la expresión de las lectinas de unión al ácido siálico, mientras que en lo referente a la expresión de TFF se encontró una sobreexpresión en branquias a bajas dosis de OA. Además, los niveles de HSP71 se encontraron también sobreexpresados en todos los tratamientos en hepatopáncreas, y a bajas dosis en branquia [ver Figura 27].

### 3.5. DESARROLLO

Se llevó a cabo el estudio de la expresión de los 2 genes siguientes: la suprabasina (SBSN) relativa a la diferenciación, y la F-espondina (FSPO) relativa al crecimiento celular. Los resultados indicaban una sobreexpresión significativa en todos los tejidos, marcadamente elevada a bajas dosis (200 células/L), que recobra su estado normal con tratamientos más severos (20000 células/L), lo que indica que son genes relevantes en la respuesta precoz al tóxico. Es destacable la sobreexpresión de la F-espondina a bajas dosis en hepatopáncreas [ver Figura 27].

### 3.6. BIOMARCADORES POSIBLES DE CONTAMINACIÓN

Se analizó la expresión de otros dos transcritos elegidos debido a su mayor representación en las genotecas pero sin resultados claros de homología en

BLAST, con lo que se le asignaron los nombres biomarcador S y biomarcador AV. En concreto, uno de estos ESTs, el biomarcador S, presenta dominios de homología considerable (E-value  $\approx 10^{-25}$ ) con un receptor rico en cisteína que reconoce lipoproteínas de baja densidad (dominio SR) [Figura 26]. Pero al margen de ésto, la mayor homología que presenta en BLAST es con una proteína de *Strongylocentrotus purpuratus* relacionada con tumores cerebrales malignos, y no comparte ni el 40% de identidad.

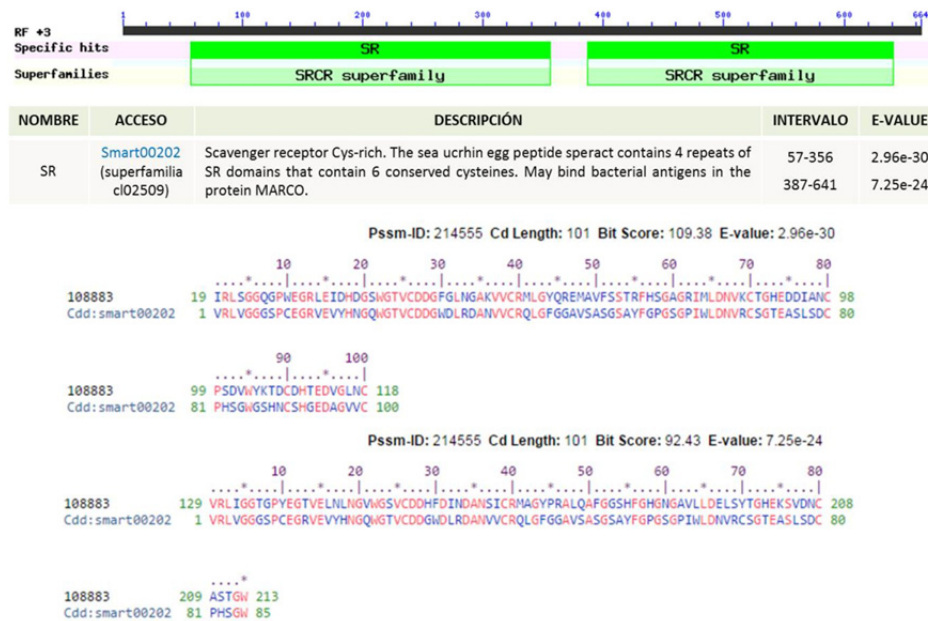
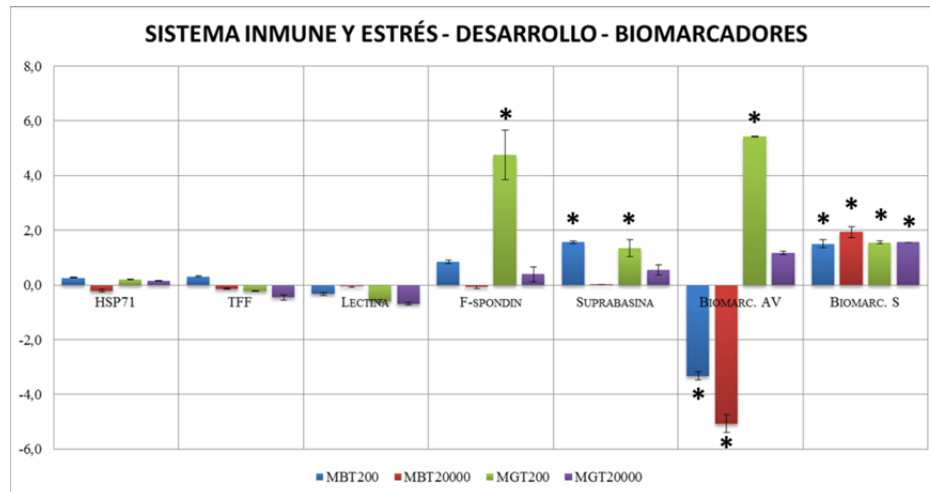


Figura 26. Dominios hallados por BLASTX en la secuencia de aminoácidos del posible biomarcador S (secuencia nº 108883), altamente representado en las genotecas de individuos tratados con OA. En la tabla se describe el dominio que mejor se ajusta a los intervalos indicados de la secuencia en cuestión, su código de acceso en la base de datos y su E-value o parámetro que describe el número de resultados de homología de la secuencia dada esperados por azar en una determinada base de datos. Se muestra también el alineamiento de la secuencia con este dominio indicando en azul aquellos aminoácidos que varían respecto al consenso, y en rojo aquellos conservados.

La expresión de estos genes a 200 y 20000 células/L puede observarse en la *Figura 27*. En ambos genes hay un cambio drástico en los perfiles de sobreexpresión y/o represión tras tratamientos con dosis bajas de OA. Cabe destacar el comportamiento del gen biomarcador AV a tratamientos severos donde los niveles de expresión vuelven a valores similares a los basales [*ver Figura 27*].



*Figura 27. Datos logarítmicos de expresión de siete genes, relacionados con el sistema inmune y estrés (los tres primeros), con el desarrollo (los dos siguientes) y como biomarcadores de contaminación (los dos últimos). Para ello fueron analizados por PCR-RT en branquias (MBT) y hepatopáncreas (MGT) de mejillones incubados durante un día con 200 y 20000 células/L de *P. lima*. Se muestran los datos de dos pools de cDNA (1.1 y 2.2). Se marcan con asteriscos aquellos valores de expresión significativos.*



#### 4. CARACTERIZACIÓN DE SIETE SUBUNIDADES RELATIVAS A LAS FOSFATASAS PP1 Y PP2A

Como hemos indicado en este trabajo, cada proteína **PP1** funcional consta de una subunidad catalítica altamente conservada en eucariotas, y una subunidad reguladora (subunidad R) variable. Las interacciones entre ambas subunidades son cruciales para explicar las funciones del complejo proteico ya que es la subunidad R quien dirige a la subunidad catalítica hacia el compartimento subcelular específico y modula su especificidad de sustrato.

Los resultados obtenidos a partir de la caracterización de las secuencias de genotecas de hepatopáncreas relacionadas con PPs permitieron identificar dos isoformas de subunidades catalíticas completas y dos isoformas de subunidades reguladoras en *Mytilus galloprovincialis*. A continuación se caracterizan brevemente los ORF (“*Open Reading Frame*” o marco de lectura abierto) de cada una:

- ✚ *PP1\_CATALYTIC\_SUBUNIT\_ALPHA* → secuencia de 1896 nucleótidos que codifica para una proteína de 37.3 kDa con 329 aminoácidos, presenta un 99% de homología con una secuencia de la ostra *Crassostreaas gigas* (*sequence ID*: EKC23784.1). Sus dominios conservados se muestran en la *Figura 28*.

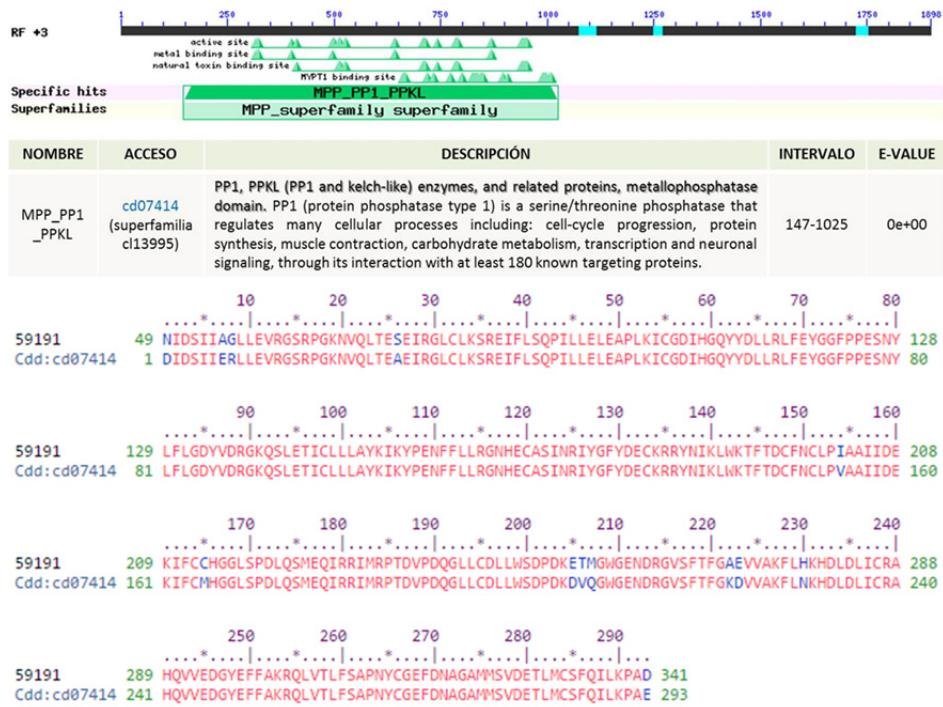


Figura 28. Dominios conservados de la proteína identificada en *M. galloprovincialis* como la subunidad catalítica alpha de PPI (secuencia n° 59191). En la tabla se describe el dominio que mejor se ajusta al intervalo indicado de la secuencia dada, su código de acceso y su valor E, que informa sobre la significatividad del alineamiento. Se muestra también el alineamiento a nivel de proteína de la secuencia obtenida con este dominio (secuencia inferior), destacando en azul los aminoácidos variables y en rojo los conservados.

✚ *PPI\_CATALYTIC\_SUBUNIT\_GAMMA* → secuencia de 1210 nucleótidos que codifica para una proteína de 35.2 kDa con 307 aminoácidos, presenta un 81% de homología con una secuencia predicha del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* (sequence ID: XP\_794664.2). Esta isoforma se localizó a partir de secuencias pertenecientes únicamente a las genotecas *reverse* de hepatopáncreas. En la Figura 29 se representan sus dominios conservados.



Figura 29. Dominios conservados de la proteína identificada en *M. galloprovincialis* como la subunidad catalítica gamma de PPI (secuencia n° 90212). Nótese que, en comparación con la subunidad alpha anterior [ver Figura 28], sus dominios no se consideran específicos dado que existen diferencias significativas en su secuencia. Esto viene representado por una mayor tasa de aminoácidos variables (en azul) respecto a aquellos conservados (en rojo) en el alineamiento que se muestra con la secuencia del dominio más representativo (secuencia inferior). Nótese también en la tabla las variaciones que presenta en el intervalo de homología y en el valor E que informa sobre la significatividad del alineamiento.

- ✚ *PPI\_REGULATORY\_SUBUNIT\_10* → secuencia parcial de 997 nucleótidos encontrada en las genotecas tratadas, con un 61% de homología con una secuencia de la ostra *Crassostrea gigas* (sequence ID: EKC19845.1).
- ✚ *PPI\_REGULATORY\_SUBUNIT\_12A* → secuencia parcial de 480 nucleótidos encontrada en las genotecas tratadas, con un 66% de homología con una secuencia de la ostra *Crassostrea gigas* (sequence

ID: EKC18372.1). Presenta un dominio PLC-beta C terminal (de fosfolipasa-beta C).

Por otra parte, cada proteína **PP2A** funcional consiste en un núcleo heterodimérico enzimático, formado por una subunidad estructural y una subunidad catalítica, que se une a distintas subunidades reguladoras estructuralmente relacionadas. De nuevo tanto las subunidades reguladoras directamente como la subunidad estructural y su flexibilidad conformacional indirectamente son clave para la modulación de la actividad fosfatasa sobre el sustrato adecuado.

En este trabajo se identificaron dos isoformas de la subunidad catalítica, una isoforma de la subunidad estructural y tres isoformas de subunidades reguladoras en *Mytilus galloprovincialis*. A continuación se caracterizan brevemente los ORF de cada una:

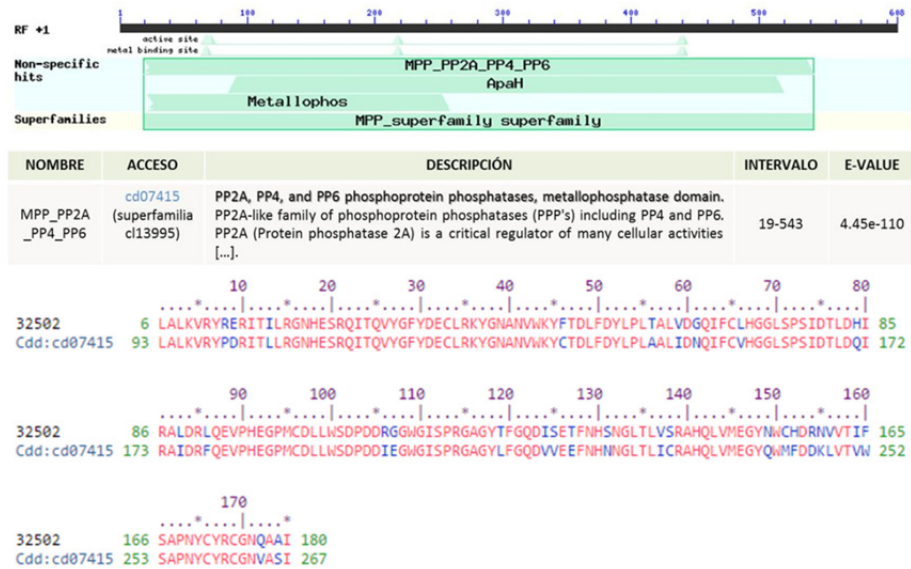
- 🚩 *PP2A\_CATALYTIC\_SUBUNIT\_ALPHA* → secuencia de 1995 nucleótidos que codifica para una proteína de 35.8 kDa con 312 aminoácidos, presenta un 96% de homología con una secuencia de la babosa marina *Aplysia californica* (sequence ID: XP\_005100173.1). Es muy similar también a otras subunidades catalíticas de PP2A encontradas en la ostra *Crassostrea gigas* (sequence ID: EKC38582.1), en la lapa *Lottia gigantea* (sequence ID: XP\_009065210.1) o en el pez cebra *Danio rerio* (sequence ID: NP\_998458.1). Incluye varios dominios conservados que se aprecian en la *Figura 30*.



Figura 30. Dominios conservados de la proteína identificada en *M. galloprovincialis* como la subunidad catalítica alpha de PP2A (secuencia n° 7356). En la tabla se describe el dominio que mejor se ajusta al intervalo indicado de la secuencia dada, su código de acceso y su valor E o parámetro que describe el número de resultados de homología de la secuencia dada esperados por azar en una determinada base de datos. Se muestra también el alineamiento a nivel de proteína de la secuencia obtenida en mejillón con este dominio (secuencia inferior), indicando en azul los aminoácidos variables y en rojo aquellos conservados.

✚ *PP2A\_CATALYTIC\_SUBUNIT\_BETA* → secuencia parcial de 601 nucleótidos que se amplificó mediante el uso de cebadores degenerados y presenta un 99% de homología con isoformas de la subunidad catalítica de PP2A de abeja la *Apis dorsata* (sequence ID: XP\_006620954.1), del pato *Anas platyrhynchos* (sequence ID:

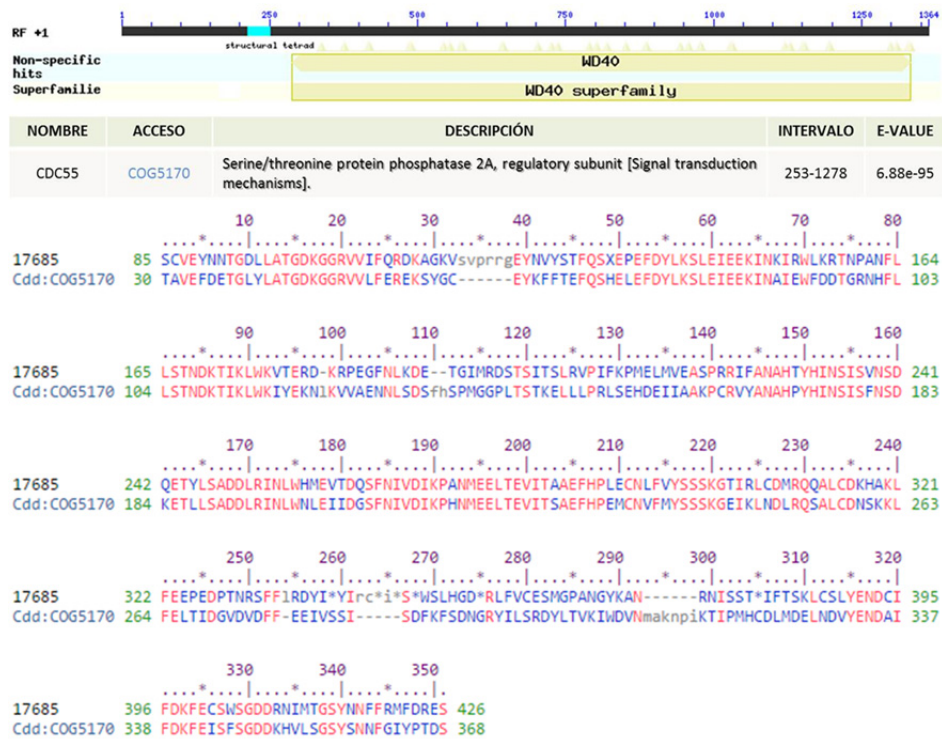
EOB07367.1), o del oso panda *Ailuropoda melanoleuca* (sequence ID: EFB24270.1). A nivel nucleotídico presenta diferencias significativas con la isoforma *alpha* de la subunidad catalítica de PP2A aislada en *M. galloprovincialis* (182 nucleótidos variantes). En la *Figura 31* se aprecian los motivos conservados que presenta, concordantes con los exhibidos por esta isoforma *alpha*.



*Figura 31. Dominios conservados de la proteína parcial identificada en M. galloprovincialis como la subunidad catalítica beta de PP2A (secuencia n° 32502). En la tabla se describe el dominio que mejor se ajusta al intervalo indicado de la secuencia dada, su código de acceso y su valor E que informa sobre la significatividad del alineamiento. Se muestra también el alineamiento a nivel de proteína de la secuencia obtenida con este dominio (secuencia inferior) indicando en azul los aminoácidos variables y en rojo aquellos conservados. Al margen de que este dominio está incompleto en su extremo 5', nótese la existencia de diferencias sustanciales en su secuencia aminoacídica con respecto al mismo dominio encontrado en la isoforma *alpha* [ver Figura 30].*



✚ *PP2A\_REGULATORY\_SUBUNIT\_55kDa* → secuencia de 1363 nucleótidos que codifica para una proteína de 51.3 kDa con 445 aminoácidos, presenta un 93% de homología con una proteína de la ostra *Crassostrea gigas* (*sequence ID*: EKC35778.1) e incluye un dominio conservado CDC55 que se aprecia en la *Figura 32*.



*Figura 32. Dominio conservado CDC55 de la proteína identificada en M. galloprovincialis como la subunidad reguladora de 55 kDa de PP2A (secuencia n° 17685). En la tabla se muestra su número de acceso, el intervalo de homología con la secuencia de mejillón y su valor E que informa sobre la significatividad del alineamiento. Se muestra también el alineamiento a nivel de proteína de la secuencia obtenida con este dominio (secuencia inferior), destacando en azul los aminoácidos variables y en rojo aquellos conservados.*

✚ *PP2A\_REGULATORY\_SUBUNIT\_56kDa\_DELTA* → secuencia de 2041 nucleótidos que codifica para una proteína de 65.7 kDa con 564 aminoácidos. Presenta un 83% de homología con una proteína de la ostra *Crassostreas gigas* (sequence ID: EKC28886.1) y sus dominios conservados se reflejan en la *Figura 33*.



*Figura 33. Dominios conservados de la proteína identificada en M. galloprovincialis como la subunidad reguladora delta de la familia B56 de PP2A (secuencia nº 18549). En la tabla se describe el dominio que mejor se ajusta, el intervalo de alineamiento, su código de acceso y su valor E o parámetro indicativo de la significatividad del alineamiento. Se muestra también el alineamiento a nivel de proteínas de este dominio*



(secuencia inferior) con la secuencia obtenida en mejillón, destacando en azul los aminoácidos variables y en rojo aquellos conservados.

✚ *PP2A\_REGULATORY\_SUBUNIT\_56KDA\_EPSILON* → secuencia de 1914 nucleótidos que codifica para una proteína de 51.6 kDa con 440 aminoácidos. Presenta un 89% de homología con una proteína de la lapa *Lottia gigantea* (sequence ID: XP\_009065773.1), e incluye los mismos dominios que la isoforma “PP2A CAT 56kDa delta” pero con variaciones sustanciales que se pueden apreciar en la *Figura 34*.



*Figura 34. Dominios conservados de la proteína identificada en M. galloprovincialis como la subunidad reguladora epsilon de la familia B56 de PP2A (secuencia n° 17728). En la tabla se describe el dominio que mejor se ajusta, su código de acceso, el intervalo donde alinea con la secuencia obtenida y su valor E que informa de la significatividad del alineamiento. En el alineamiento se destacan en azul los*

aminoácidos que difieren con la secuencia de mejillón y en rojo aquellos conservados. Nótese también la presencia de diferencias a nivel aminoacídico con la isoforma “PP2A REG 56kDa delta” descrita anteriormente [ver Figura 33].

- ✚ *PP2A\_SCAFFOLD\_SUBUNIT\_ALPHA* → secuencia de 2588 nucleótidos que codifica para una proteína de 65.2 kDa con 600 aminoácidos y presenta un 87% de homología con una proteína de la ostra *Crassostrea gigas* (sequence ID: EKC43171.1).

La *Tabla 10* resume los principales parámetros encontrados en aquellas ORFs completas relativas a las proteínas fosfatasa serina-treonina. Se excluyen por tanto las secuencias parciales de las dos subunidades reguladoras de PP1 y de la subunidad catalítica beta de PP2A halladas en *M. galloprovincialis*:

NOMBRE CONSENSO: RESULTADO DE BLASTP	% DE IDENTIDAD DE BLASTP	ORFs	PROTEÍNA
		■ TAMAÑO ■ %CG	● TAMAÑO ● PM ● PUNTO ISOELÉCTR.
<b>PP1 CAT <i>alpha</i>:</b> <i>PP1 catalytic subunit alpha isoform</i> ( <i>Crassostrea gigas</i> )	99%	■ 990 nt ■ 36.9%	● 329 aa ● 37.298 kDa ● 6.25
<b>PP1 CAT <i>gamma</i>:</b> <i>PP1-like PREDICTED catalytic subunit</i> ( <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> )	81%	■ 924 nt ■ 36.0%	● 307 aa ● 35.193 kDa ● 5.10
<b>PP2A CAT <i>alpha</i>:</b> <i>PP2A PREDICTED catalytic subunit</i> <i>beta isoform-like (Aplysia californica)</i>	96%	■ 939 nt ■ 38.2%	● 312 aa ● 35.875 kDa ● 5.36

<p><b>PP2A REG scaffold:</b> PP2A regulatory subunit 65 kDa alpha isoform (<i>Crassostrea gigas</i>)</p>	87%	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 1803 nt</li> <li>■ 40.0%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 600 aa</li> <li>● 65.241 kDa</li> <li>● 8.11</li> </ul>
<p><b>PP2A REG 55 kDa:</b> PP2A regulatory subunit 55 kDa subunit B alpha isoform (<i>Crassostrea gigas</i>)</p>	93%	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 1338 nt</li> <li>■ 40.6%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 445 aa</li> <li>● 51.312 kDa</li> <li>● 7.99</li> </ul>
<p><b>PP2A REG 56 kDa delta:</b> PP2A regulatory subunit 56 kDa delta isoform (<i>Crassostrea gigas</i>)</p>	83%	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 1695 nt</li> <li>■ 35.7%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 564 aa</li> <li>● 65.757 kDa</li> <li>● 7.74</li> </ul>
<p><b>PP2A REG 56 kDa epsilon:</b> PP2A regulatory subunit 56 kDa PREDICTED epsilon isoform (<i>Lottia gigantea</i>)</p>	89%	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ 1323 nt</li> <li>■ 35.2%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 440 aa</li> <li>● 51.610 kDa</li> <li>● 7.54</li> </ul>

Tabla 10. Parámetros descritos para los genes completos de PP1 y PP2A identificados en mejillón. Se muestra el mejor resultado obtenido en BLASTP y el porcentaje de identidad con éste. En lo relativo a la secuencia nucleotídica de la ORF se refleja su longitud y el porcentaje en CGs. En lo referente a la secuencia aminoacídica de la proteína resultante se muestra su longitud, su peso molecular y el punto isoeléctrico.

## 5. RESULTADOS DE PCR-RT CON LAS SUBUNIDADES CATALÍTICAS DE PP1 Y PP2A

Se efectuó el análisis de la expresión de los genes codificantes para las subunidades catalíticas de PP1 (isoformas *alpha* y *gamma*) y PP2A (isoforma *alpha*).

En los tres genes se encontró una tendencia a la sobreexpresión en branquias con tratamientos suaves con OA que disminuía conforme se aumentaba el tratamiento. Esta disminución se agudizaba más con la isoforma “PP1 CAT *alpha*”, la cual se reprimía a elevadas dosis de OA. En hepatopáncreas, sin embargo, se encontró una tendencia a la represión con exposiciones bajas al tóxico, que, de nuevo, disminuía conforme se aumentaba el tratamiento, detectando efectos de sobreexpresión con el tratamiento más severo. En este caso, esta disminución es más leve en la isoforma “PP1 CAT *alpha*”, la cual presenta una expresión similar en casos control y en casos de tratamiento severo de OA con 20000 células/L [ver Figura 35].

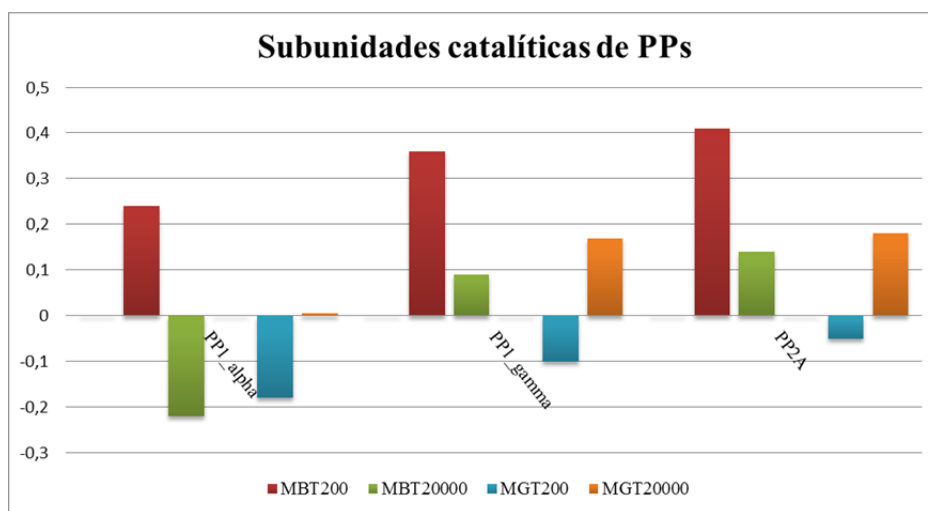


Figura 35. Datos logarítmicos de expresión de las distintas isoformas de las subunidades catalíticas de PP1 y PP2A, analizados por PCR-RT en branquias (MBT) y hepatopáncreas (MGT) de mejillones incubados durante un día con 200 y 20000 células/L de *P. lima*.

## 6. ANÁLISIS EVOLUTIVO DE LAS SUBUNIDADES CATALÍTICAS DE PP1 Y PP2A

La filogenia de las secuencias aminoacídicas identificadas como subunidades catalíticas de PP1 y PP2A en mejillón fue reconstruida tras la ejecución de una extensiva prospección de datos moleculares en otras especies que permiten la evaluación de las sustituciones producidas en dichas secuencias [ver *Tablas Anexas 01 y 02*].

### 6.1. ANÁLISIS EVOLUTIVO DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA PP1

La topología resultante del árbol filogenético reconstruido para la subunidad catalítica de PP1 y basado en las secuencias de proteínas se muestra en la *Figura 36*. Este análisis filogenético revela la presencia de tres grandes grupos monofiléticos apoyada por los elevados valores de confianza correspondientes a cada subunidad catalítica de PP1 (*alpha*, *beta* y *gamma*).

Entre las secuencias analizadas, “PP1 CAT *alpha*” se localiza muy próxima a la subunidad catalítica *alpha* de PP1 de otros moluscos, lo que confirma que la primera es efectivamente una isoforma *alpha* [ver *Figura 36*]. En concreto, los análisis de homología revelan en torno a un 98% de similitud con secuencias “PP1-*alpha catalytic subunit-like*” de *Crassostrea gigas* (*sequence ID*: EKC23784.1), *Aplysia californica* (*sequence ID*: XP\_005111155.1) y *Lottia gigantea* (*sequence ID*: XP\_009048328.1).

Por otro lado, “PP1 CAT *gamma*” ocupa una posición basal en la topología [ver *Figura 36*], bastante alejada de las isoformas correspondientes a invertebrados. Además, los análisis de homología a nivel de proteínas revelaron que “PP1 CAT *gamma*” exhibía una similitud no mayor del 80% con la

secuencia “PP1-2-like isoform” del gasterópodo *Aplysia californica* (sequence ID: XP\_005101598.1) y con una proteína hipotética del gasterópodo *Lottia gigantea* (sequence ID: XP\_009064257.1). También y no menos importante, a diferencia del resto de isoformas que presentan un tamaño de 330 aminoácidos, esta subunidad “PP1 CAT gamma” encontrada en mejillón consta de tan sólo 310 aminoácidos.

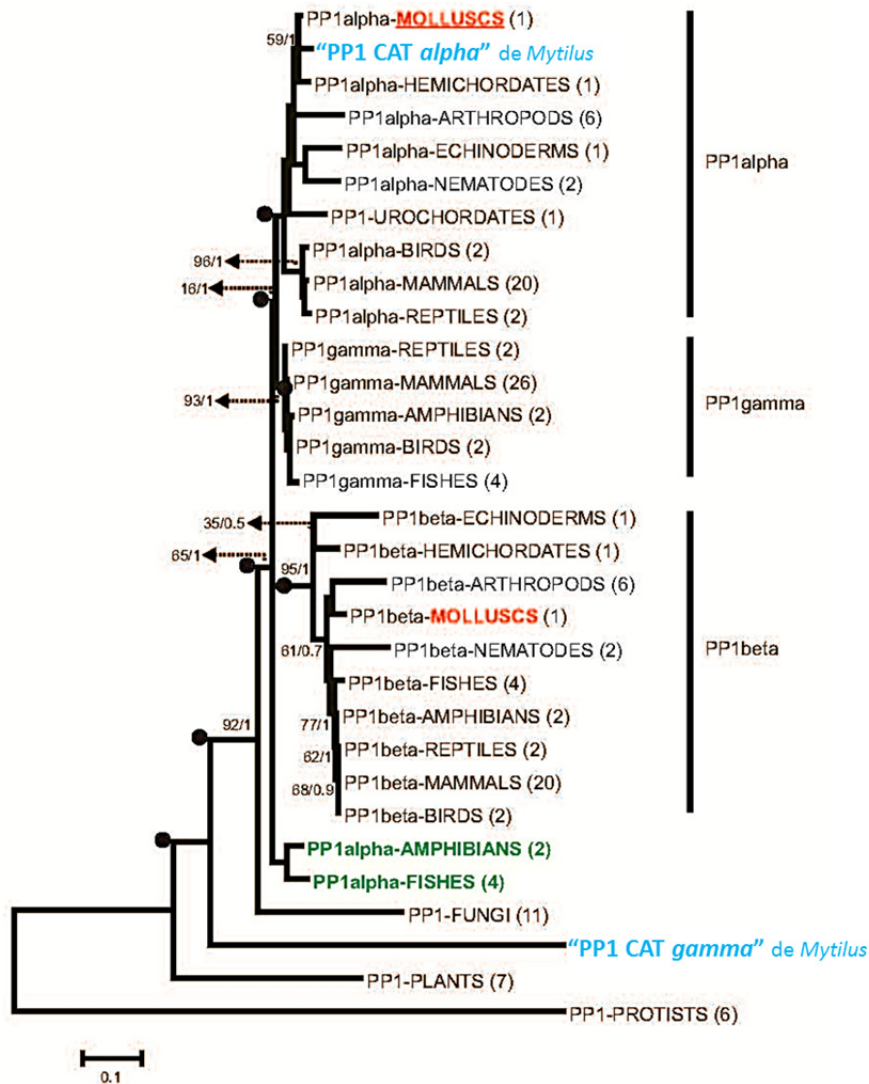


Figura 36. Reconstrucción de la filogenia de la subunidad catalítica de PP1 a nivel de secuencias proteicas en eucariotas utilizando el método de Máxima Verosimilitud. El número sobre las ramas internas representa los valores de bootstrap no-paramétrico (1000 pseudorréplicas) seguido de la probabilidad posterior bayesiana (sólo se indican si los valores de bootstrap  $\geq 50\%$  o de probabilidad posterior  $\geq 0.5$ ). Los círculos negros en los nodos internos indican las desviaciones significativas de la hipótesis del reloj molecular a lo largo de la filogenia ( $p < 0.001$ ). Los grupos monofiléticos correspondientes a las distintas subunidades catalíticas se indican en el margen derecho del árbol.

## 6.2. ANÁLISIS EVOLUTIVO DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA PP2A

La topología resultante del árbol filogenético basado en secuencias proteicas reconstruido para la subunidad catalítica de PP2A se muestra en la Figura 37. En este caso, este análisis filogenético indica la presencia de dos grandes grupos monofiléticos apoyada por los elevados valores de confianza de las isoformas *alpha* y *beta* de subunidades catalíticas de PP2A. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría con PP1, la diferenciación funcional de las subunidades catalíticas de PP2A se restringe a organismos vertebrados.

En este caso, la única subunidad catalítica de PP2A caracterizada en *M. galloprovincialis* está localizada filogenéticamente próxima al grupo de Invertebrados [Figura 37]. En concreto, los análisis de homología muestran un 96% de similitud de “PP2A CAT *alpha*” con la subunidad catalítica *beta* de PP2A de *Aplysia californica* (sequence ID: XP\_005100173.1) y de *Crassostrea gigas* (sequence ID: EKC38582.1).

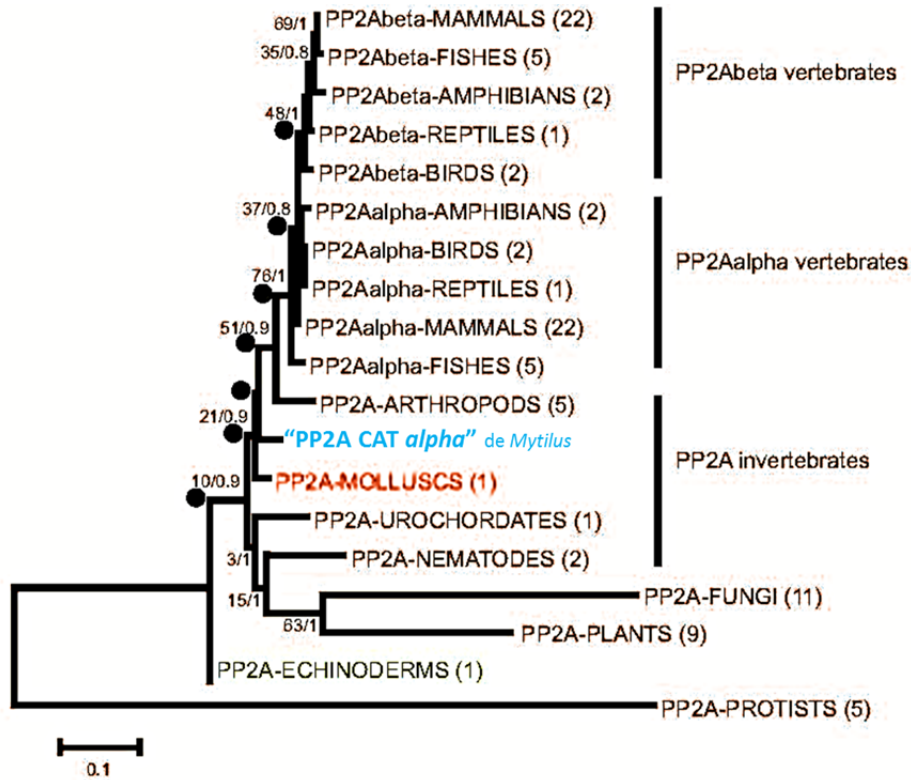


Figura 37. Reconstrucción de la filogenia de la subunidad catalítica de PP2A a nivel de secuencias proteicas en eucariotas utilizando el método de Máxima Verosimilitud. El número sobre las ramas internas representa los valores de bootstrap no-paramétrico (1000 pseudorréplicas) seguido de la probabilidad posterior bayesiana (sólo se indican si los valores de bootstrap  $\geq 50\%$  o de probabilidad posterior  $\geq 0.5$ ). Los círculos negros en los nodos internos indican las desviaciones significativas de la hipótesis del reloj molecular a lo largo de la filogenia ( $p < 0.001$ ). Los grupos monofiléticos correspondientes a las distintas subunidades catalíticas se indican en el margen derecho del árbol.



## 7. ESTUDIO DE LA NATURALEZA DE LOS EPISODIOS SELECTIVOS IMPLICADOS EN LA DIVERSIFICACIÓN DE LAS SUBUNIDADES CATALÍTICAS DE PP1 Y PP2A

Una vez confirmada la divergencia a partir de un antecesor común de las subunidades catalíticas de PP1 y PP2A de forma temprana durante la evolución de los Cordados, se definió la naturaleza de la selección natural implicada. En ambos casos se encontraron desviaciones significativas de la hipótesis de relojes moleculares globales ( $p < 0.001$ ). Los análisis de los relojes moleculares locales revelaron también una desviación significativa en varios nodos internos de las filogenias reconstruidas respecto al comportamiento teórico esperado, especialmente en aquellos nodos que conducen a los distintos grupos monofiléticos presentes en las subunidades catalíticas de PP1 y PP2A ( $p < 0.001$ ). [ver Figuras 36-39].

De forma complementaria a los análisis sobre el tipo de selección, se combinaron análisis bayesianos y de Máxima Verosimilitud a través del “*Mixed Effect Model of Evolution*” (MEME) con el objetivo de localizar los sitios individuales sujetos a selección diversificadora. En el caso de las subunidades catalíticas de PP1 se identificaron once codones correspondientes a las posiciones 2, 32, 130, 178, 316, 327 y 334 ( $p < 0.1$ ). Los análisis filogenéticos de las mutaciones en esas posiciones revelan que dichos cambios en los codones 32 y 334 estarían muy probablemente implicados en la diferenciación de la isoforma *gamma* de vertebrados.

En el caso de las subunidades catalíticas de PP2A, tan sólo se identificaron tres codones sujetos a episodios de selección diversificadora, en concreto se trata de los codones 64, 82 y 329.

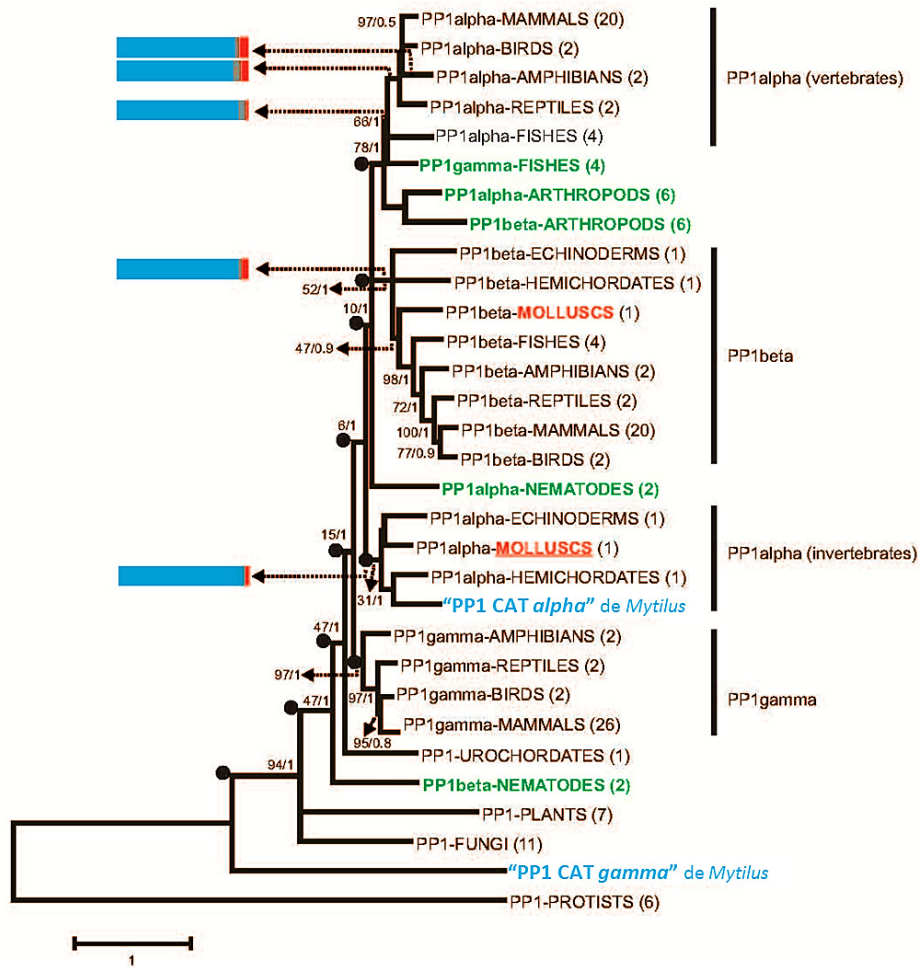


Figura 38. Filogenia del gen *PPI*. Los niveles de confianza y la presencia/ausencia de relojes moleculares locales se indican en la Figura 36. Los valores de significatividad de los episodios adaptativos ( $p \leq 0.05$ ) se representan en el nodo interno correspondiente. La intensidad de la selección se representa en las barras de la izquierda en color rojo ( $\omega > 5$ ), gris ( $\omega = 1$ ) y azul ( $\omega = 0$ ), cuyo ancho es proporcional a los sitios incluidos dentro de cada clase.

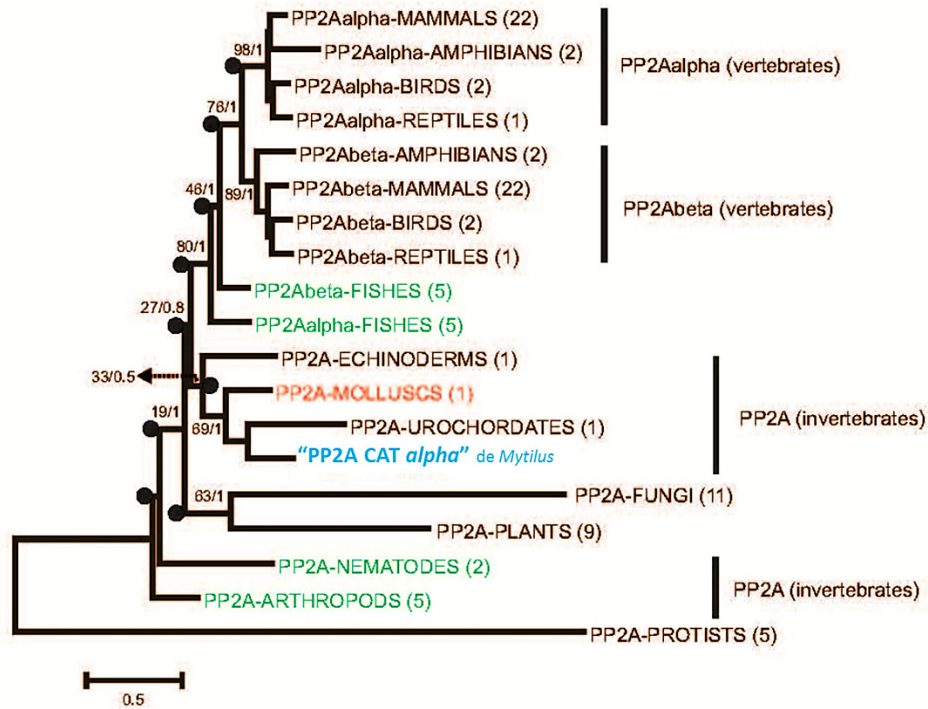
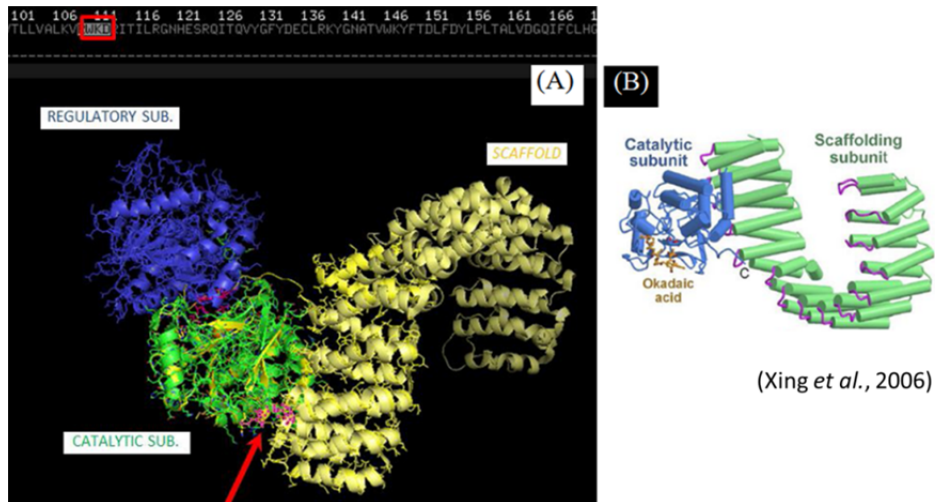


Figura 39. Filogenia del gen PP2A. Los niveles de confianza y la presencia/ausencia de relojes moleculares locales se indican en la Figura 37. Los valores de significatividad de los episodios adaptativos ( $p \leq 0.05$ ) se representan en el nodo interno correspondiente.

## 8. ANÁLISIS DE LA EMULACIÓN ESTRUCTURAL TRIDIMENSIONAL DE LA HOLOENZIMA PP2A

Los análisis realizados con el software PHYRE permiten elucidar la conformación estructural del trímero de PP2A. Esto facilita la localización espacial de aquellas sustituciones de la subunidad catalítica encontradas en los alineamientos con el *top-hit* en BLASTP y permite confirmar si dichas modificaciones son significativas funcionalmente.

En la *Figura 40* se muestra la estructura holotrimérica de las tres subunidades de PP2A (catalítica, reguladora y estructural) y la ubicación espacial de uno de los motivos variantes encontrados: WKD. Es un tripéptido localizado en los aminoácidos 99-101 del motivo conservado de “PP2A CAT *alpha*” reflejado en la *Figura 30*.



*Figura 40. (A) Resultado de la simulación estructural del trímero de PP2A en M. galloprovincialis. La subunidad scaffold se representa en amarillo, la subunidad catalítica en verde y la subunidad reguladora en azul. La flecha roja indica el motivo WKD, variable en la subunidad catalítica, localizado en el área de unión al scaffold; (B) Estructura del núcleo enzimático de PP2A unido al OA (Xing et al., 2006).*

# DISCUSIÓN



## 1. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN MEJILLONES TRATADOS CON OA: HERRAMIENTA ÚTIL EN BIOMONITORIZACIÓN AMBIENTAL

Actualmente, además de la importancia inherente que presenta la comprensión de los procesos de detoxificación en bivalvos, es indiscutible la necesidad de estudios de investigación sobre métodos de control de biotoxinas en el medio marino. El uso de biomarcadores genéticos de contaminación para la biomonitorización de episodios tóxicos marinos ha experimentado un auge en esta última década (**Sarkar *et al.*, 2006; Viarengo *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 2012; Stambuk *et al.*, 2013**), sin embargo para su identificación es necesario conocer con mayor precisión el transcriptoma del organismo centinela a estudio.

Recientemente se han comenzado a integrar diversos enfoques ómicos en el estudio del genoma de bivalvos marinos (Genómica, Proteómica, Metabolómica, Transcriptómica, Epigenómica), principalmente debido a los recientes avances en las tecnologías de secuenciación (*next-generation sequencing*) y a la sustancial reducción de los costes asociados. No obstante, la caracterización de genomas bivalvos es todavía un reto dada la falta de datos de referencia, la presencia de secuencias específicas características, la alta densidad de regiones repetitivas y el aumento de los niveles de polimorfismo (**Suárez-Ulloa *et al.*, 2013B**).

Actualmente en lo tocante al mejillón *Mytilus galloprovincialis* existen distintos proyectos basados en la construcción de librerías de cDNA cuyo objetivo en última instancia es conseguir una base de datos o catálogo de genes completo del mismo, tanto a nivel general (*database species-centered*) como específicamente en relación a la expresión al OA (*database functionally-centered*). Por ejemplo, la base de datos MytiBase consta de aproximadamente

25000 ESTs obtenidos a partir de diecisiete librerías de cDNA en casos control o como resultado de diversos tratamientos [ver Tabla 11] (Venier *et al.*, 2009; <http://mussel.cribi.unipd.it/>) y permitió el estudio de la respuesta transcriptómica del mejillón ante diversos episodios de estrés ambiental.

NOMBRE DE LA LIBRERÍA DE CDNA	TEJIDO	DESCRIPCIÓN
DiG01	Hepatopáncreas	Mejillones tratados durante tres días con OA
DiG02	Hepatopáncreas	Mejillones tratados con bacterias inactivadas por calor
Ese00	Mezcla de tejidos [pie, gónada, manto, músculo aductor, hemolinfa, hepatopáncreas y branquia]	Mejillones control
GdG01	Hepatopáncreas y branquias	Mejillones tratados con compuestos orgánicos y/o metales pesados
Gll01	Branquias	Mejillones tratados con bacterias inactivadas por calor
Hae01 - Hae05	Hemolinfa	Mejillones control, tratados con bacterias inactivadas por calor y tras infección viral
MxT01 - MxT04	Mezcla de tejidos [pie, gónada, manto...]	Mejillones control
Nor01	Mezcla de tejidos [pie, gónada, manto...]	Mejillones control
Tst00 – Tst01	Mezcla de tejidos [pie, gónada, manto...]	Mejillones control

Tabla 11. Resumen de las librerías de cDNA pertenecientes a *M. galloprovincialis* construidas en Venier *et al.* (2009). En la primera columna se aprecia el nombre de la librería o genoteca de cDNA, en la segunda columna el tejido de procedencia, y en la última columna el organismo de procedencia más el tratamiento al que fue sometido.

En otros estudios se recopilaron catálogos de genes obtenidos por pirosecuenciación pertenecientes a diversos tejidos de mejillones control, tales como branquia, hepatopáncreas, pie o manto, alcanzando, entre todos, un total de 170000 ESTs aproximadamente (Craft *et al.*, 2010).

Más recientemente en nuestro grupo se construyó la base de datos CHROMEVALOA, que consta de aproximadamente 900000 ESTs y permite la comprensión de los mecanismos asociados a la cromatina que contrarrestan los efectos provocados por el OA en mejillones, tales como la reparación del ADN entre otros (Suárez-Ulloa *et al.*, 2013A; <http://chromevaloa.udc.es/web/index.html>).



Sin embargo, cabe recordar que actualmente en las bases de datos públicas están disponibles las secuencias de poco más de 380000 ESTs pertenecientes a especies de la clase *Bivalvia*, y tan sólo 68000 concretamente del género *Mytilus*, lo cual apoya la necesidad de más estudios sobre el genoma del mejillón (**Tanguy et al., 2013**). Además, a pesar del elevado número de ESTs generados para determinadas especies de moluscos bivalvos como *Stroglyocentrotus purpuratus* o *Crassostrea gigas*, los estudios llevados a cabo en el mejillón *M. galloprovincialis* continúan siendo muy escasos. Esto es debido a que, a pesar de que este tipo de estudios suelen ser el primer paso en la mayoría de los Proyectos Genoma desarrollados, el panorama científico actual está más decantado al estudio de los efectos del OA sobre células humanas (**Cohen et al., 1990; Ciminiello et al., 2006; Fujiki et al., 2009; Munday, 2013**). De estos estudios se ha demostrado, por ejemplo, la capacidad carcinogénica, mutagénica, teratogénica, citotóxica, genotóxica, neurotóxica, inmunotóxica y embriotóxica que presenta el OA sobre diversas estirpes celulares humanas (**Valdiglesias et al., 2013**).

En este trabajo se estudió el perfil transcriptómico de mejillones control y mejillones expuestos a dos concentraciones de OA durante un día. De todos los transcritos secuenciados, los aproximadamente 55000 ESTs, se obtuvo un porcentaje de secuencias sin similitud con ninguna proteína conocida en la base de datos GeneBank de 28.9%, tras secuenciación convencional (319 de las 1103 secuencias totales), y de 44.3%, tras secuenciación masiva (24400 de las 54520 secuencias totales). De hecho, la clasificación del total de secuencias que sí presentaron homología según la especie de procedencia de estos genes homólogos recalca la necesidad de un mayor esfuerzo en aras de incrementar el conocimiento de secuencias de mejillón [ver Figura 17].

En conjunto, se aportó la secuencia de 24721 genes aún desconocidos [ver Tablas 05 y 09]. Sin embargo, la falta de homología y la escasez de secuencias

en las bases de datos de organismos invertebrados acuáticos dificultan el desarrollo y uso de biomarcadores moleculares en las especies centinela en ambientes marinos. La existencia de un transcriptoma más detallado es necesario para cubrir los huecos existentes y poder identificar genes clave frente a la presencia de OA que actualmente aún no pueden ser identificados.

Sin embargo, a través de los resultados obtenidos en este trabajo se concluye que el uso de librerías de sustracción (SSH) es una herramienta útil para el estudio de la expresión diferencial de genes entre distintos grupos (control y tratado), así como para la identificación de genes implicados en funciones biológicas específicas, especialmente cuando el organismo a estudio carece de datos genómicos previos (**Huang et al., 2007**). Conforme a esto, varios autores concluyen que en torno a la mitad de los genes aislados en genotecas de sustracción no habrían sido identificados como genes diferencialmente expresados mediante el uso de chips génicos o *microarrays* exclusivamente, en especial en el caso de genes poco expresados (**Cao et al., 2004**). Indicativo de ello es el elevado número de estudios que utilizan esta metodología para la identificación de posibles biomarcadores de contaminación y para obtener asimismo un mayor entendimiento de la toxicología molecular en un organismo dado. Por ejemplo véase en este trabajo la identificación de los posibles biomarcadores AV y S dado su evidente patrón de sobreexpresión tras la exposición a bajas concentraciones de OA. De forma similar, uno de los temas más abordados, dadas sus aplicaciones en acuicultura, es el estudio de los genes diferencialmente expresados en ostras incubadas con el protozoo *Perkinsus marinus* a través de genotecas SSH (**Tanguy et al., 2004**). Asimismo, son abundantes los estudios del perfil transcriptómico de diversos moluscos bivalvos infectados con parásitos, virus o metales pesados, muchas veces dirigidos hacia el estudio de genes relacionados con inmunidad y estrés oxidativo (**Li et al., 2013**).

Dados los grandiosos avances alcanzados en los últimos años, se ha posicionado a este campo de investigación como una nueva sub-disciplina de la Toxicología: la Toxicogenómica (**Aardema et al., 2002**). Actualmente diversas técnicas “ómicas” continúan profundizando en la metodología más adecuada para el descubrimiento de potenciales marcadores de contaminación marina en organismos centinela cuyo genoma permanece aún prácticamente desconocido (**Campos et al., 2012; Suárez-Ulloa et al., 2013B**).

En este trabajo se obtuvieron, tras el ensamblaje de las secuencias procedentes de NGS, un total de 55938 ESTs (22019 en branquias y 33919 en hepatopáncreas) de mejillón relacionados con la respuesta celular desencadenada ante la presencia de OA. La agrupación de estos genes diferencialmente expresados según los términos GO permitió obtener una idea general de los procesos bioquímicos o fisiológicos perturbados por el tratamiento con OA, y una serie de secuencias génicas útiles como posibles biomarcadores de exposición al tóxico.

La identificación de ESTs permite a su vez la realización de estudios con microarrays, como los llevados a cabo en *M. galloprovincialis* a través del *MytArray 1.0* (1714 secuencias) que revelaron 101 secuencias sobreexpresadas o reprimidas tras la exposición a una mezcla de metales y compuestos orgánicos, vinculadas a la señalización celular, la estructura celular, el metabolismo de glucosa y aminoácidos, el control del ciclo celular y la respuesta al estrés (**Venier et al., 2006**). Otros estudios con microarrays de *Mytilus edulis* (3025 secuencias) identificaron 57 secuencias diferencialmente expresadas tras la incubación con cadmio y/o hierro, potencialmente útiles como biomarcadores, que se relacionaban con funciones de respuesta al estrés y procesos metabólicos (**Poynton et al., 2014**). Estos estudios concuerdan con el presente trabajo en la caracterización de una rápida respuesta desencadenada en los mejillones ante la presencia del tóxico con el objetivo de proteger su

entidad y aclimatarse al episodio tóxico, involucrando con ello principalmente procesos de estrés y de transformación metabólica de sustancias.

## **2. EL ANÁLISIS DEL PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DEL MEJILLÓN PONE DE MANIFIESTO LA PRESENCIA DE UNA RESPUESTA PRECOZ A LA PRESENCIA DE OA**

Se han llevado a cabo múltiples estudios sobre los efectos de otros contaminantes, como metales pesados o hidrocarburos, en mejillones u otros organismos centinela y en diversos tejidos, identificando fenómenos de bioacumulación útiles para el desarrollo de programas de biomonitorización (**Brown *et al.*, 2006; Zuykov *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014**).

Los datos observados en la bibliografía en cuanto a la rapidez de la respuesta, tales como los estudios con microarrays o experimentos con células humanas, muestran similitudes entre los patrones de expresión génica de mejillones control y de mejillones tratados con elevadas concentraciones de OA y/o durante largos períodos de tiempo (**Venier *et al.*, 2006; Manfrin *et al.*, 2010**). Por ejemplo el patrón de expresión en hepatopáncreas de la F-espondina y del biomarcador AV observado en la *Figura 27* refleja este parecido entre ejemplares control y ejemplares tratados con 20000 células/L, mientras que los ejemplares tratados con 200 células/L muestran una marcada sobreexpresión. Esto es reflejo de la presencia de una serie de mecanismos desencadenados ante un umbral mínimo de toxina que permiten al mejillón adaptarse al episodio tóxico.

Con el objetivo de estudiar el perfil transcriptómico del mejillón desencadenado por bajas concentraciones de OA en el medio y perfilar la rápida respuesta que genera dicho organismo para aclimatarse, se focalizó este

estudio en los patrones de expresión génica de mejillones incubados durante cortos períodos de tiempo con OA. En concreto, los genes identificados en este trabajo están en relación con el tratamiento de un día de exposición a un cultivo de *Prorocentrum lima* (dinoflagelado productor de OA) a dos concentraciones distintas: 200 y 20000 células/L (Carvalho Pinto-Silva *et al.*, 2003; Prado-Álvarez *et al.*, 2013; de Jesús Romero-Geraldo *et al.*, 2014). Tras su análisis, se encontraron un mayor número de genes sobreexpresados y reprimidos a concentraciones bajas (200 células/L) respecto a concentraciones más elevadas (20000 células/L), cuyas funciones componen la respuesta del mejillón a la presencia de OA [ver Tablas 07 y 08]. Por ejemplo, en lo referente a branquia, el componente celular citosol presenta 78 secuencias *test* respecto a 31 *reference* entre las diferencialmente expresadas, anotadas y no anotadas, tras el tratamiento con 200 células/L mientras que sólo presenta 74 *test* respecto a 46 *reference* tras el tratamiento con 20000 células/L [ver Tabla 07]. Esto es indicativo de la mayor implicación de genes en la respuesta al OA cuando su presencia es aún escasa en el medio, lo que puede permitirle al organismo una adaptación más rápida. Los ensayos de PCR-RT a tiempos de exposición cortos y elevadas concentración de OA realizados en este trabajo no muestran un patrón de expresión génica tan diferente al control como los observados en ensayos realizados a concentraciones bajas [ver p. ej. en la Figura 27 la expresión en hepatopáncreas de *F-spondin*], lo que apoya la idea de una rápida respuesta desencadenada en los mejillones ante la presencia del tóxico, aún cuando éste se encuentra en bajas concentraciones, para recuperar su estado normal sorteando la situación de estrés.

### 3. EL PROCESO DE ACLIMATACIÓN DE LOS MEJILLONES EXPUESTOS A OA COMPRENDE CAMBIOS A NIVEL DEL CITOESQUELETO, DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y DEL SISTEMA INMUNE.

Los datos obtenidos tras el análisis de las genotecas de sustracción aportan información sobre los procesos celulares más representados en la respuesta celular del mejillón al tóxico. La caracterización funcional de las distintas secuencias obtenidas en este trabajo nos ofrece pistas sobre la naturaleza de esta respuesta. En la bibliografía existen otros estudios que analizan las secuencias diferencialmente expresadas en mejillones tras la incubación con OA. Por ejemplo, **Manfrin et al., (2010)** realizaron el estudio del perfil transcriptómico diferencial de mejillones incubados con OA durante 4 días a través del empleo de un *microarray*. Estos autores identificaron como las funciones más abundantes a la respuesta al estrés, a la apoptosis y a la estructura celular. Los estudios sobre las funciones GO de los genes anotados en la MytiBase (**Venier et al., 2009**) concuerdan también en un incremento notable de la expresión diferencial de “procesos celulares” donde se incluye comunicación, diferenciación, muerte y motilidad celular, y de los “procesos metabólicos” y de “unión a proteínas”.

Concordando en gran medida con estos estudios previos, en este trabajo se exponen asociaciones estadísticamente significativas con Procesos Biológicos (BP) como metabolismo, citoesqueleto, procesos celulares y respuesta inmune o estrés, donde destacan principalmente los procesos de polimerización y plegamiento de proteínas, el transporte de membrana y los procesos relativos al ciclo celular. Del mismo modo, tras un análisis de las Funciones Moleculares (MF) más representadas, se observó que los genes identificados tras clonación y secuenciación Sanger en las genotecas SSH, sobreexpresadas y reprimidas, se

relacionaban en mayor medida con las funciones relativas al citoesqueleto y a la unión con GTP, ATP y otras proteínas.

Por otro lado, además de este método tradicional de clonación y secuenciación de forma individual de cada EST que identificó 1103 secuencias (de las cuales sólo 587 presentaron homología con alguna secuencia conocida), las genotecas MGC/MGT200 y MGT200/MGC fueron secuenciadas mediante secuenciación masiva hasta obtener un total de 55028 secuencias. La comparación de los resultados alcanzados a través del análisis de las secuencias obtenidas por pirosecuenciación y por secuenciación masiva muestra la ausencia de diferencias en cuanto a la distribución de los principales BP y MF más abundantes, arrojando una imagen casi idéntica en la representación en términos de abundancia relativa de estos términos GO [ver Figura 41].

Todo esto es indicativo tanto de los elevados requerimientos energéticos del mejillón para llevar a cabo una respuesta celular rápida ante la presencia de OA, como de la elevada movilización a través del citoesqueleto necesaria para que dicha respuesta sea efectiva en un corto período de tiempo. Es importante mencionar que entre los efectos más notables del OA en células de mamífero se encuentran la disrupción del citoesqueleto, la presencia de alteraciones en la permeabilidad de membrana y apoptosis (Leira *et al.*, 2001). En consecuencia, el proceso de aclimatación de los mejillones al OA está sometido a tres frentes: cambios en el citoesqueleto para el transporte o acumulación de tóxicos y derivados (p. ej. “*locomotion*” o “*cellular component organization*”), cambios en las vías de señalización para responder de forma distinta a estímulos externos (p. ej. “*signaling*” o “*response to stimulus*”), y cambios en el sistema inmune para la lucha contra la posible toxicidad generada (p. ej. “*cell killing*” o “*immune system process*”).

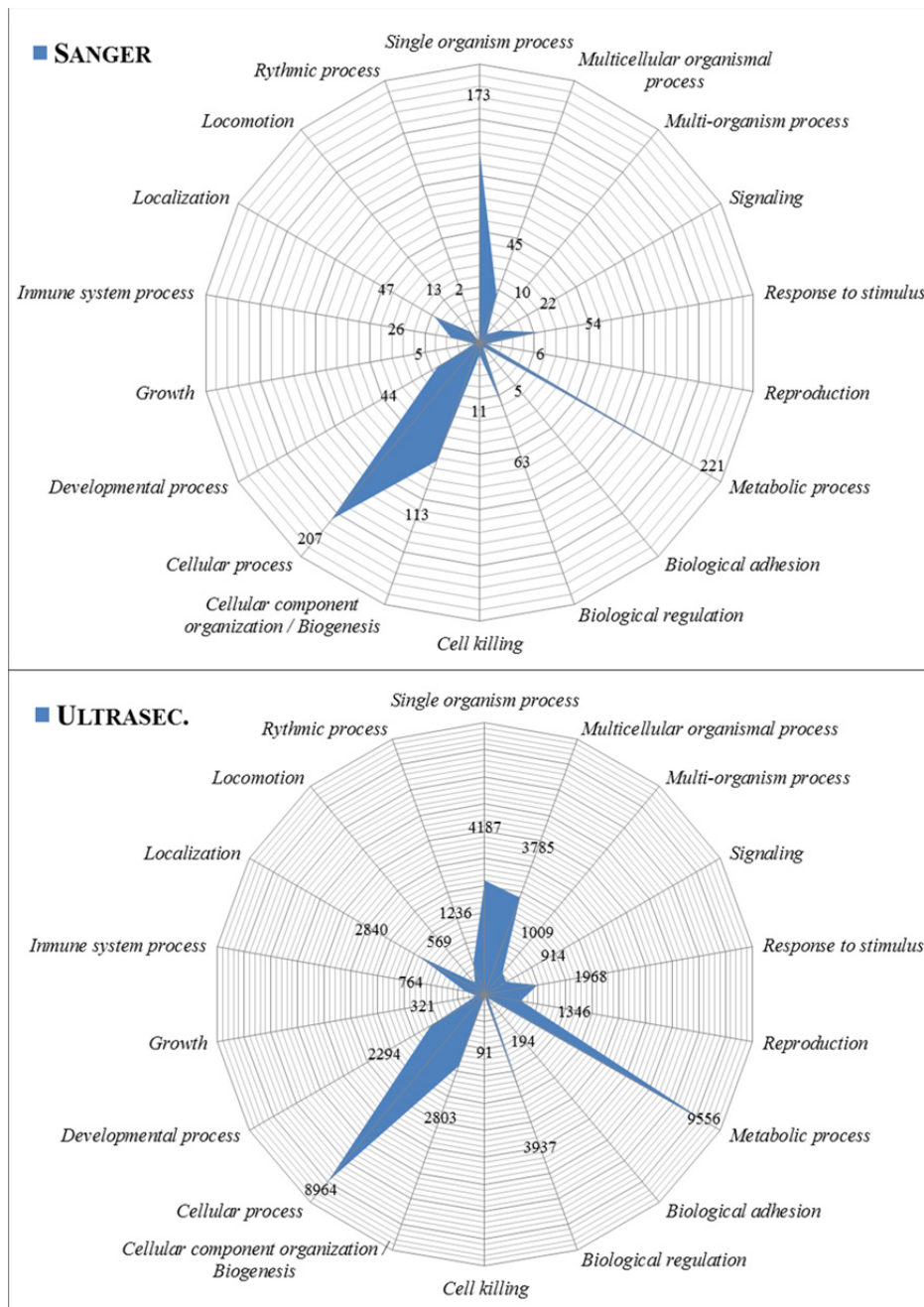


Figura 41. Comparativa entre la distribución de los Procesos Biológicos (BP) obtenida tras el análisis de las secuencias obtenidas tras clonación y secuenciación



*Sanger convencional, y tras el análisis de las secuencias obtenidas por secuenciación masiva. Los BP mayoritarios son los procesos celulares (“cellular process”), los procesos metabólicos (“metabolic process”), y los procesos de organismos sencillos (“single organism process”).*

Además, el porcentaje de genes alterados implicados en el ciclo celular y en la inducción de apoptosis podrían indicar la existencia de múltiples vías moleculares alternativas, aún desconocidas, competentes en la inhibición de la proliferación celular inducida por la presencia de OA (**Hata et al., 2013**). Del mismo modo, debido a la existencia de múltiples procesos celulares reprimidos, es importante destacar que la respuesta generada en el mejillón debido a la presencia del tóxico ocurre a expensas del funcionamiento normal del bivalvo. De hecho, la represión encontrada de las peroxirredoxinas sumada a la represión de la reductasa metionina-sulfóxido en hepatopáncreas [ver Figura 25] apuntan a un probable incremento en el daño oxidativo que ocurre en pro de una recuperación rápida del estado normal. Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que la respuesta ocurriría al margen de que ciertas funciones se sigan manteniendo y acrecentando para favorecer la recuperación del bivalvo, como revelan, por ejemplo, la sobreexpresión de catepsina y de reductasa metionina-sulfóxido en branquias [ver Figura 25], que indican una tendencia a la sobreexpresión de los procesos antioxidantes y proteolíticos.

Muchos estudios llevados a cabo con análisis de expresión de microarrays (p. ej. MytArray 1.0) (**Venier et al., 2006**) y con muestras de mejillones sometidas a tratamientos con OA más severos (de 3 a 15 días de incubación) alcanzaron datos similares respecto a la naturaleza de la estrategia de aclimatación desarrollada por el mejillón. En concreto obtuvieron una distribución de las categorías funcionales de GO diferencialmente expresadas que destacaba los procesos de estrés y apoptosis, y las estructuras celulares (**Venier et al., 2006; Huang et al., 2014**).

Una posible teoría sobre este proceso de aclimatación de los mejillones ante la presencia de OA asume la activación de un patrón de expresión génica dirigido casi exclusivamente a la metabolización, encapsulación y eliminación del tóxico. De este modo se definiría una primera fase de biotransformación para intentar reducir la toxicidad, una segunda fase de conjugación que convierta al tóxico metabolizado en un compuesto más soluble, y una tercera fase de depuración (**Rossignoli et al., 2011**). Esto podría explicar los cambios hallados en el citoesqueleto para el ensamblaje de las cápsulas y los cambios hallados en el metabolismo para degradar el OA antes o después de su encapsulación.

De acuerdo con la bibliografía existente, respecto a dichas estrategias destacarían la presencia de esterasas específicas que transformarían el OA en derivados de menor toxicidad más fáciles de excretar o detoxificar (**Rossignoli et al., 2011; Konoki et al., 2013**), y la existencia de una lipoproteína destinada a la encapsulación del tóxico y de sus derivados, que los transformaría potencialmente en variantes inocuas (**Rossignoli et al., 2010**). Este modelo de respuesta rápida estaría enfocado a la bioacumulación de OA libre, tanto en branquia como en hepatopáncreas de mejillón, permitiendo su normal funcionamiento, como por ejemplo a través del bloqueo de la inhibición de las PPs ejercida por el tóxico.

#### **4. LA COMPARACIÓN ENTRE LA RESPUESTA AL OA GENERADA EN BRANQUIA Y EN HEPATOPÁNCREAS REVELA DIFERENCIAS DADA SU FISIOLOGÍA Y FUNCIONALIDAD**

Tanto el hepatopáncreas como las branquias están implicadas en diversas funciones biológicas, como respiración, metabolismo (biotransformación) y excreción, pudiendo constituir la primera barrera a los contaminantes externos.

En este estudio, a partir de los datos obtenidos por PCR-RT se establecieron dos grupos de genes en cada tejido, sobreexpresados y reprimidos, que nos ofrecen una visión sobre la respuesta celular generada por el mejillón al OA en sendos tejidos. En términos generales y debido a la presencia de patrones de sobreexpresión a bajas concentraciones de OA seguidos de represión a concentraciones más elevadas de tóxico, se puede afirmar que las branquias responden de forma más rápida que el hepatopáncreas al OA. Además, en los resultados del Test Exacto de Fisher obtenidos con las genotecas de branquia se aprecia un efecto de represión o sobreexpresión en más términos de GO que con las genotecas de hepatopáncreas, lo cual apoya tanto la idea de una respuesta más temprana como sencillamente una respuesta diferente en branquias respecto a hepatopáncreas. Todo esto sumado al hecho de que los datos de cuantificación por LC-MS/MS no mostraron cantidades significativas de OA en branquias tratadas durante 1 día, indica claramente que, dada su funcionalidad, las branquias presentan una menor tendencia a la acumulación de toxinas respecto al hepatopáncreas.

Estas diferencias en la exposición y/o acumulación de OA entre ambos tejidos permiten interpretar los resultados obtenidos tras el análisis comparativo de las genotecas de branquia y de hepatopáncreas como una respuesta de adaptación que implica la actividad conjunta de múltiples genes siendo más rápida y temprana en el tejido branquial.

Los resultados indican que la mayoría de los genes sobreexpresados en branquia se encuentran asociados a procesos que ocurren en el citoesqueleto (p. ej. actina o tubulina). Por ejemplo, la sobreexpresión de las tubulinas [ver *Figura 23*] indica que los microtúbulos podrían jugar un papel crucial en el proceso de aclimatación. En concreto, su ensamblaje requiere GTP lo cual es consistente con el incremento detectado de actividad GTP en el análisis de las genotecas. También se detectó la sobreexpresión de CO III en hepatopáncreas,

que está implicado en la síntesis de ATP, lo que refuerza la idea de la existencia de un aporte extra de energía para llevar a cabo la respuesta celular adecuadamente. Todo ello es muestra de la importante función que las branquias desempeñan en relación al transporte de sustancias a través del citoesqueleto en respuesta a la presencia de OA.

Por su parte, los genes significativamente sobreexpresados en hepatopáncreas se asocian principalmente a procesos de detoxificación denominados en general como metabolismo de compuestos exógenos (p. ej. el citocromo P-450) (Zhang *et al.*, 2012). Además existe una leve tendencia a la sobreexpresión de genes relacionados con el desarrollo en ambos tejidos y a bajas dosis.

## **5. GENES ANALIZADOS POR PCR-RT: IDENTIFICACIÓN DE CANDIDATOS A BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A OA**

Una de las posibilidades que ofrece la evaluación del perfil de expresión de ciertos genes a distintas concentraciones de OA, además de la caracterización de la respuesta generada ante la presencia del tóxico, reside en la identificación de biomarcadores genéticos de contaminación en uno o ambos tejidos, que servirían para detectar de forma rápida e incluso a bajas concentraciones un posible episodio de contaminación (Sarkar *et al.*, 2006).

En este trabajo se seleccionaron 22 genes de los 55938 ESTs diferencialmente expresados obtenidos a partir de las genotecas SSH para su análisis por PCR-RT que se agruparon en 6 categorías: citoesqueleto, metabolismo de compuestos exógenos, metabolismo celular, sistema inmune y estrés y desarrollo.

Entre los genes analizados del citoesqueleto se encuentra la actina o unidades monoméricas de los microfilamentos responsables de la contracción muscular, la dineína o proteína motora capaz de convertir la energía química contenida en el ATP en energía mecánica para mover vesículas u otros a lo largo de los microtúbulos o para colaborar en el ensamblaje del centrosoma, la tektin3 o componente estructural de cilios y flagelos, la gelsolina o proteína de unión clave en la regulación de la polimerización de la actina e implicada en la formación de podosomas y la tubulina beta o unidades monoméricas de los microtúbulos. Todos estos genes se encuentran relacionados de un modo u otro con la movilización de vesículas a través de la célula lo que podría apoyar la presencia de un proceso de encapsulación del OA y/o de sus derivados acilados en el que estarían principalmente implicados los microtúbulos dada su tendencia a la sobreexpresión.

Para el análisis de genes relacionados con el metabolismo de compuestos exógenos o detoxificación se eligieron los CYT P-450, ya que se han catalogado como los principales responsables del metabolismo oxidativo de xenobióticos de baja especificidad, lo que les permite metabolizar un número casi ilimitado de sustratos, principalmente a través de reacciones de monooxigenación dependientes de NADPH, y acelerar así su eliminación. En concreto, su función radica en convertir los xenobióticos como el OA en moléculas más polares, más hidrosolubles y, por tanto, más fácilmente excretables, de ahí nuestro interés por estas proteínas. Sin embargo, los resultados no arrojaron datos significativos de sobreexpresión y/o represión lo que indica que probablemente la cascada de genes encargada de metabolizar el OA previo a su excreción permanece todavía desconocida.

Por otra parte en esta categoría también se analizó el gen CO III, una proteína transmembrana implicada en el ciclo de Krebs e incluido en las bicapas lipídicas de bacterias y mitocondrias. Esta enzima constituye el último eslabón

de la cadena transportadora de electrones acoplada a la translocación de protones a través de membrana y colabora en la síntesis de ATP mediada por la ATP sintasa, y su tendencia a la sobreexpresión en hepatopáncreas apunta a un posible aporte extra de ATP para llevar a cabo la respuesta de aclimatación al OA.

Entre los genes analizados del metabolismo celular se estudió el proteasoma o proteína degradadora de otras proteínas dependiente de ATP, la cathepsina B o proteína mediadora de la hidrólisis de otras proteínas independiente de ATP, la peroxirredoxina o enzima antioxidante que controla los niveles de peróxido inducidos por citoquinas y la metionina-sulfóxido reductasa que lleva a cabo la reducción enzimática de metionina-sulfóxido a metionina además de reparar el daño oxidativo en proteínas para restaurar la actividad biológica. Se aprecia una tendencia a la sobreexpresión de aquellos genes implicados en la reparación del daño oxidativo.

Por otro lado, en el análisis de genes del sistema inmune y estrés se estudió la HSP71 o proteína de 71kDa implicada en el plegamiento proteico y protección celular contra el estrés debido al calor extremo o a la presencia de toxinas.

Finalmente, es importante destacar que entre los genes analizados del desarrollo y aquellos más abundantes en las genotecas se encontraron cuatro posibles biomarcadores de exposición al OA. Existen muchos trabajos que concuerdan en la idoneidad como bioindicadores de contaminación de la evaluación del perfil de expresión de una batería de genes pertenecientes a estas categorías que cubren funciones relacionadas con la exposición y detoxificación del OA, estrés oxidativo, daño celular y efectos genotóxicos. Por ejemplo, entre otros, las variaciones en la expresión de proteínas HSP (*Heat Shock Proteins*), que se expresan en situaciones de estrés ambiental y juegan un papel clave en la degradación y maduración de proteínas, de los CIT P450 que

participan activamente en la biotransformación de xenobióticos, o de las proteínas antioxidantes que eliminan los radicales libres generados, son muy utilizadas en la monitorización de situaciones de estrés ambiental (Welch, 1993; Cravo *et al.*, 2009; Jarque *et al.*, 2014; Lacroix *et al.*, 2014).

Profundizando en cada una de estas proteínas indicativas de estrés ambiental analizadas, es relevante mencionar que la síntesis de las HSPs se incrementa en respuesta a un estrés provocado tanto por aumento de temperatura, como por daño tisular, por radiaciones o por infecciones o por intoxicaciones (Lindquist *et al.*, 1988). En este estudio también se encontró una sobreexpresión de la proteína HSP71 a bajas concentraciones de OA, lo que concuerda con su función de protección de proteínas frente a la desnaturalización, facilitando el plegamiento de las moléculas proteicas dañadas y activando la proteólisis en procesos de daño irreversible.

Por el contrario, en el caso de los genes CYT-P450 analizados no se encontraron sobreexpresiones significativas indicativas de los rápidos procesos de detoxificación del OA.

Entre los resultados ofrecidos en este estudio se encontraron 4 posibles candidatos para su uso como bioindicadores de exposición a OA que presentaban patrones significativos de sobreexpresión o represión a bajas concentraciones y con períodos cortos de exposición, entre los que se encuentra esta proteína *scavenger* (biomarcador S homólogo en bajo porcentaje a una proteína de transporte) de función aún desconocida, el biomarcador AV, y los genes de la suprabasina y de la F-espondina. Un estudio más pormenorizado de cada uno de los genes detectados en las genotecas de sustracción podría aportar información sobre la aptitud de ciertos genes marcadores seleccionados de entre todos los relacionados con la respuesta al OA, lo que sería de enorme

interés en el campo de la acuicultura para, p. ej., detectar episodios de *bloom* de forma temprana.

## **6. IMPLICACIONES DE LA CARACTERIZACIÓN DE PP1 Y PP2A EN MEJILLÓN POR PRIMERA VEZ: ESTRUCTURA Y FILOGENIA**

Dado el efecto conocido que produce el OA en las PPs, en este trabajo se identificaron secuencias relacionadas con PP1 y PP2A en mejillón para estudiar la posible presencia de diferencias significativas respecto a las secuencias homólogas encontradas en otras especies. Es importante destacar que estas secuencias génicas no se conocían hasta la fecha y, dada la ausencia de pruebas que muestren el compromiso de la viabilidad de los mejillones ante la presencia de OA, la caracterización de estas PPs en mejillón podría poner de manifiesto posibles diferencias en su interacción con el tóxico.

En lo referente a las dos isoformas encontradas de la subunidad catalítica de PP1, es importante destacar que se trata de la primera identificación de una isoforma *PP1-like* (denominada “PP1 CAT *gamma*”) totalmente distinta en cuanto a longitud, secuencia e historia evolutiva a cualquier otra subunidad catalítica de PP1 en invertebrados encontrada en las bases de datos, lo que podría indicar que no se trate de una proteína canónica de PP1. El hecho de que esta novedosa isoforma aparezca sólo en las genotecas *reverse* sugiere que pueda tratarse de un gen que se expresa más en mejillones control. Además ambas isoformas presentan diferentes patrones de expresión [ver Figura 35], observándose la sobreexpresión por término general en tratamientos más severos con OA de la isoforma *gamma* que podría ser indicativo de la consecución de un estado ya normal post-intoxicación.



Respecto a los análisis filogenéticos, todo apunta a la presencia de tres grandes grupos monofiléticos correspondientes con cada subunidad catalítica de PP1 conocida (*alpha*, *beta* y *gamma*). Esto sugiere una diferenciación funcional entre las diferentes subunidades partiendo de un antecesor común previo a la radiación de los Cordados, pues los únicos que presentan la subunidad *gamma* son peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, todos ellos vertebrados. Así podríamos concluir que los vertebrados por norma general presentan 3 isoformas de “PP1 CAT”, mientras que los invertebrados sólo presentan 2 isoformas (Lin *et al.*, 1999). Lo llamativo en este punto es la localización filogenética en posiciones basales de la isoforma “PP1 CAT *gamma*” encontrada en mejillón, que apunta a la presencia de rasgos bastante divergentes respecto a otras subunidades catalíticas de PP1 en invertebrados [ver Figura 36]. También es importante destacar que hasta el momento no se ha encontrado, a través de amplificaciones con múltiples cebadores degenerados, la esperada isoforma “PP1 CAT *beta*” que según lo esperado debería existir en invertebrados junto con la isoforma “PP1 CAT *alpha*”. Por comparación con otro invertebrado con mayor información genética disponible, cabe matizar que, curiosamente entre la gran cantidad de genes de *Strongylocentrotus purpuratus* presentes en las bases de datos no se ha identificado más de una isoforma similar a “PP1 CAT”. Por tanto, la amplificación o no en mejillones de la isoforma *beta* podría ayudar a elucidar cómo pudo evolucionar la novedosa isoforma *gamma* ya encontrada, tanto directamente a partir de la diferenciación de la aún desconocida isoforma *beta* del mejillón dejando un total de dos isoformas en estos organismos, o por duplicación y diferenciación de alguna de las restantes isoformas dando lugar a tres isoformas totales.

En conjunto, la presencia de una única subunidad catalítica de PP1 en los grupos taxonómicos localizada en las posiciones basales de la historia

filogenética (incluyendo protistas, plantas y hongos) es consistente con una diferenciación funcional de las subunidades catalíticas *alpha* y *beta* a partir de un gen ancestral de invertebrados, seguido más tarde de una diferenciación de la isoforma *gamma* en vertebrados (Lin *et al.*, 1999). Nótese sin embargo las diferencias presentes en las plantas, ya que, dada su demostrada capacidad para duplicar su genoma completo, se han encontrado muchas otras isoformas de PP1 (Smith *et al.*, 1993), aunque ninguna haya presentado una homología significativa con la “PP1-like” (o “PP1 CAT *gamma*”) encontrada en el mejillón.

En lo referente a PP2A, los datos indican la presencia de dos grandes grupos monofiléticos *alpha* y *beta* restringidos únicamente a organismos vertebrados, lo que sugiere que esta divergencia en dos linajes (*alpha* y *beta*) ocurrió de forma temprana en vertebrados durante la evolución de los Cordados. Además, el hecho de que no exista todavía diversificación en Urocordados, nivel basal en la filogenia de Cordados, apoya la idea de que se separaron posteriormente. Estas posiciones basales en la filogenia de la subunidad catalítica de PP2A están ocupadas de nuevo por protistas, plantas y hongos, donde la diferenciación funcional en las dos isoformas (Pph21, Pph22) (Sneddon *et al.*, 1990) se evidencia como resultado de un episodio de duplicación genómica ocurrido posteriormente al origen de los vertebrados a partir de un gen ancestral de invertebrados (Ronne *et al.*, 1991). Sin embargo, la presencia de isoformas adicionales de la subunidad catalítica de PP2A es de nuevo extensible a plantas, donde por ejemplo, en el caso de *Arabidopsis thaliana*, fueron encontradas más de cinco isoformas (Ariño *et al.*, 1993).

En este trabajo no se encontró ninguna posible isoforma adicional de la subunidad catalítica de PP2A, pero sí se encontró un posible pseudogen de la misma mediante el uso de cebadores degenerados [ver Figura 34]. Esta secuencia parcial de 601 nucleótidos, dadas las diferencias ya mencionadas

respecto a la secuencia completa y funcional de la subunidad catalítica de PP2A en mejillón, apunta muy posiblemente a una duplicación ocurrida en este gen.

Finalmente, los análisis realizados para tratar de definir la naturaleza de la selección natural mostraron diferencias entre ambas filogenias de PP1 y PP2A. En lo que respecta a PP1, dada la presencia de ratios heterogéneos de evolución, podría tratarse de episodios de selección diversificadora implicada en la diferenciación de las distintas subunidades. Tras el análisis de las filogenias, los resultados obtenidos confirman la existencia de episodios de selección diversificadora ( $\omega > 1$ ) en al menos cinco ramas internas en el caso de PP1 ( $p \leq 0.05$ ) [ver Figura 38].

Por el contrario, el *screening* de la filogenia reconstruida para PP2A revela una completa ausencia de selección diversificadora en los nodos internos que conducen a las subunidades *alpha* y *beta* [ver Figura 39].

## 7. INTERACCIONES ENTRE PP2A Y OA: CASO PARTICULAR DEL MEJILLÓN

Tras observar las diferencias entre mamíferos y varias especies de bivalvos a nivel de supervivencia o viabilidad durante episodios de contaminación con el OA, podemos concluir que debe existir algún tipo de respuesta que les permita a los segundos sobrevivir al margen de elevadas concentraciones. Dada la inhibición documentada que este tóxico ejerce sobre las PPs (principalmente PP2A y PP1), y el importante papel que estas enzimas presentan en el organismo, se ha planteado en esta tesis una posible diferencia entre dichas proteínas de vertebrados y bivalvos como explicación a esta viabilidad mantenida.

En concreto, se planteó en primer lugar que esta posible diferencia podría consistir en una serie de cambios aminoacídicos en la región catalítica conservada de unión al tóxico de las PPs, que permitirían que su actividad no se viese comprometida por la presencia del tóxico. Los análisis de la emulación estructural tridimensional de PP2A sumado a la bibliografía ya existente sobre la estructura de las fosfatasa podrían elucidar el papel de las fosfatasa PP1 y PP2A en moluscos bivalvos tras la exposición a OA.

La subunidad reguladora *scaffold* de PP2A sirve de andamiaje para la unión de las restantes subunidades. Contiene 15 repeticiones en tándem de un motivo de 39 residuos altamente conservado denominado HEAT (*huntingtin-elongation A-subunit TOR*) y organizado a modo de herradura extendida. Varios autores concuerdan en que las repeticiones 11 a 15 están implicadas en la unión a la subunidad catalítica (Xu *et al.*, 2006; Xing *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos con el software PHYRE mostraron que los motivos variantes que se encontraron en los alineamientos de la subunidad catalítica *alpha* de PP2A aislada en mejillón con aquellas conocidas en otras especies se localizan en esta zona “neutral” del complejo estructural o área de unión entre la subunidad catalítica y la estructural o *scaffold*, por lo que se presupone que no influyen funcionalmente en la actividad catalítica de la proteína ni en su unión al OA [ver Figura 40].

Por ello, todo indica que la subunidad catalítica de PP2A *per se* debería responder al OA del mismo modo que las restantes subunidades catalíticas conocidas de otras especies ya que no existen cambios significativos en el área de unión al tóxico. Pero ello no descarta la posibilidad de que alguna isoforma de una subunidad reguladora o algún cambio de tipo epigenético sobre la secuencia de cualquier subunidad podría significar un cambio suficiente como para que la función de este complejo multimérico no se vea comprometida en

presencia de OA. Por ejemplo, podría ser interesante analizar las secuencias de las dos isoformas identificadas en este trabajo de la subunidad reguladora “B56-family” de PP2A: la isoforma *delta* y la isoforma *epsilon*. Ambas presentan diferencias significativas ya que la primera es homóloga a una secuencia de *Crassostrea gigas* (*sequence ID*: gb|EKC28886.1|) y su alineamiento con este *top-hit* en BLASTP revela la presencia de 19 *gaps* y 95 sustituciones entre las cuales existen 57 no-sinónimas. Sin embargo la isoforma *epsilon* presenta homología con una hipotética proteína de *Lottia gigantea* (*sequence ID*: gb|ESO83517.1|) y su alineamiento en este caso con el *top-hit* en BLASTP muestra la presencia de tan sólo 25 sustituciones no-sinónimas de un total de 46 sustituciones. Los análisis evolutivos basados en métodos de distancias situaron filogenéticamente a la isoforma *delta* próxima a los gasterópodos y artrópodos, y a la isoforma *epsilon* próxima a anélidos, algunos gasterópodos y a dos especies de cestodos del *filum Platyhelminthes*. Esto podría ser indicativo de la existencia de diferencias sustanciales entre ambas subunidades reguladoras que varíen de forma notable la actividad de inhibición ejercida por el OA sobre la subunidad catalítica de PP2A.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

A la vista de los resultados podemos concluir que las subunidades catalíticas de PP1 y PP2A no son significativamente diferentes como para evitar la inhibición ejercida por el OA, por lo que las diferencias deben radicar en otros aspectos que deberán ser estudiados y confirmados. Otra posible diferencia podría basarse en la presencia de subunidades reguladoras diferentes que varíen la actividad catalítica de los complejos proteicos PP1 y PP2A en presencia de OA. Los estudios a nivel proteico con levaduras o bacterias para reconstruir los complejos con las diversas subunidades reguladoras encontradas y comprobar

su viabilidad *in vivo* ante la presencia de OA serían los más apropiados en este aspecto. También se podría comprobar la presencia de esta posible diferencia a nivel epigenético evaluando mediante chips o *microarrays* la presencia de posibles cambios a nivel de metilaciones, acilaciones o fosforilaciones ante la presencia del tóxico (Gavery *et al.*, 2010; Vandegheuchte *et al.*, 2014).

Al margen de las posibles diferencias presentes directamente sobre la secuencia de las PPs, la respuesta que diferencia a los bivalvos de los mamíferos en términos de supervivencia podría radicar en otros mecanismos externos que faciliten y aceleren la detoxificación, evitando comprometer la funcionalidad de las PPs. Así, dado el perfil transcriptómico encontrado tras el análisis de las genotecas y sumado a los demás estudios que se encuentran en la bibliografía, se podría definir esta respuesta como una combinación de mecanismos de transformación química (principalmente esterificación y acilación) y transporte celular de la toxina, que la convertirían en compuestos más inocuos y más fácilmente excretables, reduciendo al máximo la concentración de OA libre en el organismo. Los estudios de expresión de las diversas esterasas y de las proteínas de transporte identificadas en las genotecas de sustracción podrían ser valiosos para la confirmación de su posible actividad sobre la toxina permitiendo el perfilado de la respuesta celular de los bivalvos a la exposición a OA. Aunque merece la pena recordar que dado el escaso conocimiento de genes de especies de bivalvos, sería muy posible que los genes clave de esta respuesta celular permanezcan aún desconocidos en cuanto a funcionalidad a pesar de que sí se conozcan sus secuencias, lo cual dificulta enormemente su estudio.

# CONCLUSIONES





Tras el estudio de las genotecas de sustracción (SSH), sumado al análisis de ciertos genes candidatos por PCR-RT y a la caracterización molecular y evolutiva de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de varias subunidades obtenidas por 3'-5'RACE que conforman las fosfatasa del mejillón, se puede concluir que:

- Los estudios transcriptómicos a bajas concentraciones de tóxico (200 y 20000 células de *P. lima* por litro) y con tiempos cortos de exposición (1 día) son los más adecuados para conocer los mecanismos implicados en la respuesta temprana del mejillón al OA.
- De los 55028 transcritos obtenidos por secuenciación Sanger y secuenciación masiva se resaltaron, entre los Procesos Biológicos (BP) de GO, procesos metabólicos (21%), procesos celulares (18%) y procesos de organismos sencillos (15%); y entre las Funciones Moleculares (MF) de GO se destacaron las funciones de actividad catalítica (45%) y unión (35%). Ambos métodos de secuenciación coincidieron en esta distribución.
- El análisis comparativo de las genotecas SSH de branquia respecto a las de hepatopáncreas mostró la existencia de diferencias en cuanto a la asimilación y retención del OA y en cuanto a la respuesta generada por dicha toxina. El hepatopáncreas acumula mayores niveles de OA y se encuentra asociado con procesos de detoxificación mientras que las branquias se relacionan con procesos del citoesqueleto.
- El análisis comparativo de las genotecas SSH *forward* respecto a las *reverse* mostró la existencia de BP y MF (GO) sobrerrepresentados tras la exposición a OA, que conforman la respuesta temprana desencadenada por el tóxico para aclimatarse a expensas de ciertos procesos y funciones basales.

- De entre los 1103 genes obtenidos en las genotecas SSH de secuenciación Sanger se seleccionaron, en función de su abundancia, un total de 22 genes para el estudio temporal de su expresión por PCR-RT correspondientes a 5 categorías: citoesqueleto (6), detoxificación (5), metabolismo celular (4), desarrollo (2), sistema inmune y estrés (3) y biomarcadores posibles de contaminación (2).
- Tras los análisis por PCR-RT se encontraron variaciones con tendencia al alza (sobreexpresión) en los patrones de expresión de la  $\beta$ -tubulina (citoesqueleto), del CYT-1 (metabolismo de compuestos exógenos), de la catepsina (metabolismo celular), de la F-spondin (desarrollo) y del biomarcador AV (biomarcadores posibles de contaminación). Se encontraron también variaciones con tendencia a la baja (represión) en los patrones de expresión de la peroxirredoxina (metabolismo celular) y la la lectina (sistema inmune y estrés).
- A pesar del elevado porcentaje de secuencias desconocidas de *M. galloprovincialis*, esta técnica permitió identificar 4 genes como posibles candidatos para la biomonitorización de entre los 22 analizados por PCR-RT: el biomarcador AV, el biomarcador S, la F-spondin y la suprabasina.
- A partir de los datos de las genotecas SSH y de estudios con *primers* degenerados se obtuvieron, por primera vez en *M. galloprovincialis*, las secuencias completas de 7 subunidades de las fosfatasas PP1 y PP2A: PP1\_CAT\_alpha, PP1\_CAT\_gamma, PP2A\_CAT\_alpha, PP2A\_REF\_scaffold, PP2A\_REG\_55 kDa, PP2A\_REG\_56 kDa\_delta y PP2A\_REG\_56 kDa\_epsilon.
- Las 7 subunidades identificadas indican la similitud estructural con subunidades de las fosfatasas anotadas de otras especies, entre las que se destacan las subunidades catalíticas expuestas a inhibición en respuesta al OA.

- El análisis de PP1\_CAT\_γ reveló la presencia de diferencias en su secuencia a nivel de tamaño (308 aa en lugar de 330) y a nivel de secuencia concreta (81% homología en BLASTP).
- El análisis temporal de la expresión de las subunidades catalíticas por PCR-RT mostró un patrón de expresión similar entre PP1\_CAT\_γ y PP2A\_CAT\_α, que difiere con el patrón encontrado con PP1\_CAT\_α sugiriendo posibles diferencias a nivel de expresión entre ambas isoformas de PP1\_CAT.
- La reconstrucción de la filogenia de las subunidades catalíticas PP1 y PP2A mostraron una ubicación distinta de una nueva isoforma no canónica PP1\_CAT\_γ en el árbol consenso obtenido, además de una significativa presión selectiva en ciertos codones de esta subunidad. La presencia de PP1\_CAT\_γ podría estar relacionada a algún nivel con la tolerante respuesta del mejillón al OA dada su documentada invulnerabilidad.
- El estudio de la estructura tridimensional de PP2A\_CAT\_α nos indicó que la zona de unión al OA es idéntica a la presente en las restantes secuencias anotadas, lo que podría revelar la existencia de procesos de aclimatación al tóxico a otros niveles (variaciones en las subunidades reguladoras o modificaciones epigenéticas).
- Una posible teoría sobre la naturaleza de la respuesta producida por el mejillón ante la presencia de OA se basa en la rápida transformación de tóxico (acilación, metilación) que disminuiría su toxicidad sumada a una encapsulación del mismo facilitando su excreción.



# BIBLIOGRAFÍA



- Aardema, M.J. and MacGregor. (2002). Toxicology and genetic toxicology in the new era of “toxicogenomics”: impact of “-omics” technologies. *Mutat. Res.*; 499: 13-25.
- Álvarez, I., Gómez-Gesteira, M., deCastro, M., Lorenzo, M.N., Crespo, A.J.C., and Días, J.M. (2011). Comparative analysis of upwelling influence between the western and northern coast of the Iberian Peninsula. *Cont. Shelf Res.*; 31 (5): 388-399.
- Anderson, D.M. (1994). Red tides. *Sci. Am.*; 271 (2): 62-8.
- Anderson, D.M. (2009). Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean. Coast. Manag.*; 52 (7): 342.
- Anderson, D.M., Cembella, A.D. and Hallegraeff, G.M. (2012). Progress in understanding harmful algal blooms: paradigm shifts and new technologies for research, monitoring, and management. *Ann. Rev. Mar. Sci.*; 4: 143-76.
- Ares, I.R., Louzao, M.C., Espiña, B., Vieytes, M.R., Miles, C.O., Yasumoto, T. and Botana, L.M. (2007). Lactone ring of pectenotoxins: a key factor for their activity on cytoskeletal dynamics. *Cell Physiol. Biochem.*; 19 (5-6): 283-92.
- Ares, I.R., Louzao, M.C., Vieytes, M.R., Yasumoto, T. and Botana, L.M. (2005). Actin cytoskeleton of rabbit intestinal cells is a target for potent marine phycotoxins. *J. Exp. Biol.*; 208 (Pt 22): 4345-54.
- Ariño, J., Pérez-Callejón, E., Cunillera, N., Camps, M., Posas, F. and Ferrer, A. (1993). Protein phosphatases in higher plants: multiplicity of type 2A phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.*; 21 (3): 475-85.
- Aune, T. and Yndestad, M. (1993). Chapter 5: Diarrhetic shellfish poisoning, pp. 87-104. En: “Algal toxins in seafood and drinking water”, editado por

- Falconer, I.R. Elsevier Ltd., Academic Press, London (UK). ISBN: 978-0-12-247990-8.
- Bachali, S., Jager, M., Hassanin, A., Schoentgen, F., Jollès, P., Fiala-Medioni, A. and Deutsch, J.S. (2002). Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function. *J. Mol. Evol.*; 54 (5): 652-664.
- Baden, D.G. (1989). Brevetoxins: unique polyether dinoflagellate toxins. *FASEB J.*; 3 (7): 1807-17.
- Baden, D.G. and Trainer, V.L. (1993). Mode of action of toxins of seafood poisoning, pp. 49-74. En: "Algal toxins in seafood and drinking water", editado por Falconer, I.R. Elsevier Ltd., Academic Press, London (UK). ISBN: 978-0-12-247990-8.
- Beadman, H.A., Willows, R.I., Kaiser, M.J. (2002) Potential applications of mussel modeling. *Helgol. Mar. Res.*; 56 (1): 76-85.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to Multiple Testing. *J. Roy. Stat. Soc. B (Methodological)*, 57 (1): 289-300.
- Bialojan, C. and Takai, A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.*; 256 (1): 283-90.
- Bidard, J.N., Vijverberg, H.P., Frelin, C., Chungue, E., Legrand, A.M., Bagnis, R. and Lazdunski, M. (1984). Ciguatoxin is a novel type of Na<sup>+</sup> channel toxin. *J. Biol. Chem.*; 259 (13): 8353-7.



- Blanco, J., Mariño, C., Martín, H. and Acosta, C.P. (2007). Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*; 50 (8): 1011-8.
- Blanco, J., Moroño, A., Pazos, Y., Maneiro, J. and Mariño J. (1998). Trends and variations of the abundance of main PSP and DSP producing species in the Galician Rías: Environmental and Biological Influences, pp. 204–207. En: “Harmful Algae”, editado por Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L. and Wyatt T. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, New York.
- Bocchetti, R., Fattorini, D., Pisanelli, B., Macchia, S., Oliviero, L., Pilato, F., Pellegrini, D. and Regoli, F. (2008). Contaminant accumulation and biomarker response in caged mussel, *Mytilus galloprovincialis*, to evaluate bioavailability and toxicological effects of remobilized chemicals during dredging and disposal operations in harbour areas. *Aquatic Toxicol.*; 89: 257-266.
- Botana, L.M., Rodriguez-Vieytes, M., Alfonso, A. and Louzao, M.C. (1996). Phycotoxins: Paralytic shellfish poisoning and diarrhetic shellfish poisoning, pp. 1147-1169. En: “Handbook of Food Analysis - Residues and Other Food Component Analysis, volume 2”, editado por Nollet, L.M.L. CRC Press, London (UK). ISBN: 978-0824750373.
- Branch, G.M. and Steffani, C.N. (2004). Can we predict the effects of alien species? A case-history of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*; 300: 189-215. J EXP MAR BIOL ECOL
- Bricelj, V.M., Connell, L., Konoki, K., Macquarrie, S.P., Scheuer, T., Catterall, W.A. and Trainer, V.L. (2005). Sodium channel mutation leading to

- saxitoxin resistance in clams increases risk of PSP. *Nature*; 434 (7034): 763-767.
- Brown, M., Davies, I.M., Moffat, C.F. and Craft, J.A. (2006). Application of SSH and a macroarray to investigate altered gene expression in *Mytilus edulis* in response to exposure to benzo[a]pyrene. *Mar. Environ. Res.*; 62 (Supplement 1): S128-35.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C. and Viarengo, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.*; 247 (2-3): 295-311.
- Cajaraville, M.P., Olabarrieta, I. and Marigómez, I. (1996). *In vitro* activities in mussel haemocytes as biomarkers of environmental quality: a case of study in the Abra Stuary (Bisacy Bay). *Ecotox. Environ. Safe.*; 35: 253-260.
- Campos, A., Tedesco, S., Vasconcelos, V. and Cristobal, S. (2012). Proteomic research in bivalves: towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. *J. Proteomics*; 75 (14): 4346-4359.
- Canesi, L., Negri, A., Barmo, C., Banni, M., Gallo, G., Viarengo, A. and Dondero, F. (2011). The organophosphate chlorpyrifos interferes with the responses to 17 $\beta$ -estradiol in the digestive gland of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One*; 6: e19803.
- Cao, W., Epstein, C., Liu, H., DeLoughery, C., Ge, N., Lin, J., Diao, R., Cao, H., Long, F., Zhang, X., Chen, Y., Wright, P.S., Busch, S., Wenck, M., Wong, K., Saltzman, A.G., Tang, Z., Liu, L. and Zilberstein, A. (2004). Comparing gene discovery from Affymetrix GeneChip microarrays and Clontech PCR-select cDNA subtraction: a case study. *BMC Genomics*; 5 (1): 26.

- Caplan, C.E. (1998). Ciguatera fish poisoning. *CMAJ*; 159 (11): 1394.
- Carvalho Pinto-Silva, C.R., Ferreira, J.F., Costa, R.H.R., Belli Filho, P., Creppy, E.E. and Matias, W.G. (2003). Micronucleus induction in mussels exposed to okadaic acid. *Toxicon*; 41 (1): 93-97.
- Catterall, W.A., Trainer, V. and Baden, D.G. (1992). Molecular properties of the sodium channel: a receptor for multiple neurotoxins. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*; 85 (5 Pt 2): 481-485.
- Cellura, C., Toubiana, M., Parrinello, N. and Roch, P. (2006). HSP70 gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*. *Dev. Comp. Immunol.*; 30 (11): 984-997.
- Chapman, P.M. (1997). Is bioaccumulation useful for predicting impacts? *Mar. Pollut. Bull.*; 36: 282-283.
- Ciminiello, P. and Fattorusso, E. (2006). Bivalve molluscs as vectors of marine biotoxins involved in seafood poisoning. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*; 43: 53-82.
- Cohen, P., Holmes, C.F. and Tsukitani, Y. (1990). Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem. Sci.*; 15 (3): 98-102.
- Comisión Europea 2004. Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004. Diario Oficial de la Unión Europea L 139/55.
- Comisión Europea 2005. Reglamento (CE) N° 2074/2005 de la Comisión de 5 de diciembre de 2005. Diario Oficial de la Unión Europea L 338/27.

Comisión Europea 2011. Reglamento (UE) N° 15/2011 de la Comisión del 10 de enero de 2011 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 2074/2005 en lo relativo a los métodos de análisis reconocidos para la detección de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos vivos Diario Oficial de la Unión Europea L 6/3.

Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M. and Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*; 21 (18): 3674-3676.

Consello Regulador Mexillón de Galicia. 2010. [www.mexillondeg Galicia.org](http://www.mexillondeg Galicia.org)

Cordier, S., Monfort, C., Miossec, L., Richardson, S. and Belin, C. (2000). Ecological analysis of digestive cancer mortality related to contamination by diarrheic shellfish poisoning toxins along the coasts of France. *Environ. Res.*; 84 (2): 145-150.

Craft, A.J., Gilbert, J.A., Temperton, B., Dempsey, K.E., Ashelford, K., Tiwari, B., Hutchinson, T.H. and Chipman, J.K. (2010). Pyrosequencing of *Mytilus galloprovincialis* cDNAs: tissue-specific expression patterns. *PLoS ONE*; 5 (1): e8875.

Cravo, A., Lopes, B., Serafim, A., Company, R., Barreira, L., Gomes, T. and Bebianno, M.J. (2009). A multibiomarker approach in *Mytilus galloprovincialis* to assess environmental quality. *J. Environ. Monit.*; 11 (9): 1673-1686.

De Jesús Romero-Geraldo, R., García-Lagunas, N. and Hernández-Saavedra, N.Y. (2014). Effects of in vitro exposure to diarrheic toxin producer *Prorocentrum lima* on gene expressions related to cell cycle regulation and immune response in *Crassostrea gigas*. *PLoS One*; 9 (5): e97181.

- Del Campo, M.; Toledo, H. and Lagos, N. (2013). Okadaic acid toxin at sublethal dose produced cell proliferation in gastric and colon epithelial cell lines. *Mar Drugs*; 11 (12): 4751-4760.
- Delpont, W., Poon, A.F., Frost, S.D. and Kosakovsky Pond, S.L. (2010). Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics*; 26 (19): 2455-2457.
- Desbiens, M. and Cembella, A. (1993). Growth of the blue mussel *Mytilus edulis* on toxic *Alexandrium fundyense* and effects of gut passage on dinoflagellate cells, pp. 395-399. En: "Toxic phytoplankton blooms in the sea", editado por Smayda, T.J. and Shimizu, Y. Elsevier Science Ltd., Developments in Marine Biology Series, New York (USA). ISBN: 978-0444897190.
- Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y.F. and Siebert, P.D. (1999). Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol.*; 303: 349-380.
- Dickey, R.W. and Plakas, S.M. (2010). Ciguatera: a public health perspective. *Toxicon*; 56 (2): 123-136.
- Dimitriadis, V.K., Domouhtsidou, G.P. and Cajaraville, M.P. (2004). Cytochemical and histochemical aspects of the digestive gland cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (L.) in relation to function. *J. Mol. Histol.*; 35 (5): 501-509.
- Dominguez, H.J., Paz, B., Daranas, A.H., Norte, M., Franco, J.M. and Fernández, J.J. (2010). Dinoflagellate polyether within the yessotoxin, pectenotoxin and okadaic acid toxin groups: characterization, analysis and human health implications. *Toxicon*; 56 (2): 191-217.

- Dondero, F., Banni, M., Negri, A., Boatti, L., Dagnino, A. and Viarengo, A. (2011). Interactions of a pesticide / heavy metals mixture in marine bivalves: a transcriptomic assessment. *BMC Genomics*; 12 (1): 195.
- Drummond, A.J. and Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolut. Biol.*; 7: 214.
- Durán, N.C., Acuña C.R. y Santiago C.J. (1990). El mejillón: biología, cultivo y comercialización. Ed. Fundación Caixa Galicia. Coruña. Ser. Estudios Sectoriales, 5: 1-183. ISBN: 978-8440479969.
- Escobar, L.I., Salvador, C., Martínez, M. and Vaca, L. (1998). Maitotoxin, a cationic channel activator. *Neurobiology (Bp)*; 6 (1): 59-74.
- Espiña, B. and Rubiolo, J.A. (2008). Marine toxins and the cytoskeleton: pectenotoxins, unusual macrolides that disrupt actin. *FEBS J.*; 275 (24): 6082-6088.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations Ed.) (2005). “Marine Biotoxines”. Food and Nutrition Paper nº80, Roma (Italy).
- Fernández, J.J., Candenás, M.L., Souto, M.L., Trujillo, M.M. and Norte, M. (2002). Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Curr. Med. Chem.*; 9 (2): 229-262.
- Fernández, M.L., Míguez, A., Cacho, E. and Martínez, A. (1996). Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of spanish mussels. *Toxicon*, 34 (3): 391-387.
- Fernández-Tajes, J., Laffon, B. and Méndez, J. (2010). The use of biomarkers in bivalve molluscs for the evaluation of marine environment pollution, pp. 409-429. En: “Impact, Monitoring and Management of Environmental Pollution”, editado por Ahmed El-Nemr. Nova Science Publishers Inc. -

- Pollution Science, Technology and Abatement Series, (New York). ISBN: 978-1608764877.
- Fessard, V., Grosse, Y., Pfohl-Leszkowicz, A. and Puiseux-Dao, S. (1996). Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes. *Mutat. Res.*; 361 (2-3): 133-141.
- Field, I.A. (1922). Biology and economic value of the sea mussel *Mytilus edulis*. *Bulletin of the Bureau of Fisheries of the United States*; 38: 127-259.
- Figueras, A. (2007) “Biología y cultivo del mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) en Galicia”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid (España). ISBN: 978-84-00-08526-1.
- Fiorentini, C., Matarrese, P., Fattorossi, A. and Donelli, G. (1996). Okadaic acid induces changes in the organization of F-actin in intestinal cells. *Toxicol.*; 34 (8): 937-945.
- Fladmark, K.E., Serres, M.H., Larsen, N.L., Yasumoto, T., Aune, T. and Doskeland, S.O. (1998). Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat and salmon hepatocytes. *Toxicol.*; 36 (8): 1101-1114.
- Flórez-Barrós, F.; Padro-Álvarez, M.; Méndez, J. and 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 A*; 74 (15-16): 971-979.
- Franco Leis, M. (2006). La miticultura en Galicia: una actividad de éxito y con futuro. *Revista Galega de Economía*; 15 (1). ISSN: 1132-2799.
- Frohman, M.A. (1994). On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends). *PCR Methods Appl.*; 4 (1): S40-58.

- Fujiki, H. and Suganuma, M. (2009). Carcinogenic aspects of protein phosphatase 1 and 2A inhibitors. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*; 46: 221-54.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Takagi, K., Uda, N., Wakamatsu, K., Yamada, K., Murata, M. and Yasumoto, T. (1988). Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. *Jpn. J. Cancer Res.*; 79 (10): 1089-93.
- Furey, A., O'Doherty, S., O'Callaghan, K., Lehane, M. and James, K.J. (2010). Azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish: toxicological and health considerations. *Toxicon*; 56 (2): 173-90.
- Gabrieldes, G. (1997). The MED POL Bionitoring Program Concerning the effects of pollutants on marine organisms along the Mediterranean Coasts. UNEP (OCA)/MEDWG. 132/3, (Athens).
- García, C., Pruzzo, M., Rodríguez-Unda, N., Contreras, C. and Lagos, N. (2010). First evidence of okadaic acid acyl-derivative and dinophysistoxin-3 in mussel samples collected in Chiloe Island, Southern Chile. *J. Toxicol. Sci.*; 35 (3): 335-44.
- García, L., García, F., Llorens, F., Unzeta, M., Itarte, E. and Gómez, N. (2002). PP1/PP2A phosphatases inhibitors okadaic acid and calyculin A block ERK5 activation by growth factors and oxidative stress. *FEBS letters*; 523 (1-3): 90-94.
- Gavery, M.R. and Roberts, S.B. (2010). DNA methylation patterns provide insight into epigenetic regulation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *BMC Genomics*; 11: 483.



- Gerdol, M., De Moro, G., Manfrin, C., Venier, P. and Pallavicini, A. (2012). Big defensins and mytimacins, new AMP families of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Develop. Comparat. Immun.*; 36: 390-399.
- Gerssen, A., Pol-Hofstad, I.E., Poelman, M., Mulder, P.P.J., van den Top, H.J., and de Boer, J. (2010). Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch Situation. *Toxins*; 2 (4): 878-904.
- Gestal, C., Costa, M.M., Figueras, A. and Novoa, B. (2007). Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: identification of new antimicrobial peptides. *Gene*; 406: 134-143.
- Gibson, G. and Muse S.V. (2004). "A primer of Genome Science". Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, (Massachusetts), 2<sup>nd</sup> edition. ISBN: 978-0878932320.
- Goldberg, E.D., Bertine, K.K. (2000). Beyond the mussel watch – new directions for monitoring marine pollution. *Sci. Total Environ.*; 247 (2-3): 165-174.
- Gosling, E. (1992). The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. Development in Aquaculture and Fisheries Sciences, vol. 25, Elsevier, Amsterdam.
- Gosling, E. (2003). Bivalve Molluscs: Biology, ecology and culture. John Wiley&Sons Ed., Fishing News Books, Blackwell Science (Oxford). 443 pp. ISBN: 978-0852382349.

- Green, C.D., Simons, J.F., Taillon, B.E. and Lewin, D.A. (2001). Open systems: panoramic views of gene expression. *J. Immunol. Methods*; 250: 67-79.
- Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguière, C., Girardot, A.L., Garnier, J., Horeau, A., Bachère, E., Escoubas, J.M., (2003). Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*; 303: 139–145.
- Habermann E. (1989). Palytoxin acts through Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Toxicon*; 27 (11): 1171-1187.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*; 41: 95-98.
- Hallegraeff, G. M. (1993). A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*; 32 (2): 79-99.
- Hallegraeff, G. M. (1995). Harmful algal blooms: a global overview, pp. 1-22. En: “Manual on Harmful Marine Microalgae”, editado por Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. and Enevoldsen, H.O. IOC Manuals and Guides N° 33, UNESCO, Paris. ISBN: 9231038710.
- Hampson, D.R. and Manalo, J.L. (1998). The activation of glutamate receptors by kainic acid and domoic acid. *Nat. Toxins*; 6 (3-4): 153-158.
- Hansen, P.D. and Usedom, A.V. (1997). New biosensors for environmental analysis. *Frontiers in Biosensorics II EXS*; 81: 109-120.
- Hata, Y., Timalina, S. and Maimaiti, S. (2013). Okadaic Acid: a tool to study the hippo pathway. *Mar. Drugs*; 11 (3): 896-902.

- Haystead, T.A., Sim, A.T., Carling, D., Honnor, R.C., Tsukitani, Y., Cohen, P. and Hardie, D.G. (1989). Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature*; 337 (6202): 78-81.
- Hellemans, J., Mortier, G., de Paepe, A., Speleman, F. and Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.*; 8: R19.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* (NY); 11 (9): 1026-1030.
- Hillmann, A., Dunne, E. and Kenny, D. (2009). cDNA amplification by SMART-PCR and suppression subtractive hybridization (SSH)-PCR. *Methods Mol. Biol.*; 496: 223-243.
- Huang X., Li, Y., Niu, Q. and Zhang, K. (2007). Suppression Subtractive Hybridization (SSH) and its modifications in microbiological research. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 76: 753-760.
- Huang, L., Zou, Y., Weng, H.W., Li, H.Y., Liu, J.S. and Yang, W.D. (2014). Proteomic profile in *Perna viridis* after exposed to *Prorocentrum lima*, a dinoflagellate producing DSP toxins. *Environ. Pollut.*; 196C: 350-357.
- Hubbert, F. (1996). A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Europ. J. Biochem.*; 240: 302-306.
- Hüning, A.K., Melzner, F., Thomsen, J., Gutowska, M.A., Krämer, L., Frickenhaus, S., Rosenstiel, P., Pörtner, H.O., Philipp, E.E. and Lucassen,

- M. (2013). Impacts of seawater acidification on mantle gene expression patterns of the Baltic Sea blue mussel: implications for shell formation and energy metabolism. *Mar. Biol.*; 160: 1845-1861.
- James, K.J., Carey, B., O'Halloran, J., van Pelt, F.N. and Skrabáková, Z. (2010). Shellfish toxicity: human health implications of marine algal toxins. *Epidemiol Infect.*; 138 (7): 927-940.
- Jarque, S., Prats, E., Olivares, A., Casado, M., Ramón, M. and Piña, B. (2014). Seasonal variations of gene expression biomarkers of *Mytilus galloprovincialis* cultured populations: temperature, oxidative stress and reproductive cycle as major modulators. *Sci. Total Environ.*; 499: 363-372.
- Jauffrais, T., Marcaillou, C., Herrenknecht, C., Truquet, P., Séchet, V., Nicolau, E., Tillmann, U. and Hess, P. (2012). Azaspiracid accumulation, detoxification and biotransformation in blue mussels (*Mytilus edulis*) experimentally fed *Azadinium spinosum*. *Toxicon*; 60 (4): 582-595.
- Jeng, M.S., Jeng, W.L., Hung, T.C., Yeh, C.Y., Tseng, R.J., Meng, P.J., and Han, B.C. (2000). Mussel watch: a review of Cu and other metals in various marine organisms in Taiwan, 1991–98. *Environ. Pollut.*; 110 (2): 207-215.
- Jenny, M.J., Ringwood, A.H., Lacy, E.R., Lewitus, A.J., Kempton, J.W., Gross, P.S., Warr, G.W. and Chapman, R.W. (2002). Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Mar. Biotechnol.*; 4: 81–93.
- Jenny, M.J., Chapman, R.W., Mancina, A., Chen, Y.A., McKillen, D.J., Trent, H., Lang, P., Escoubas, J.M., Bachere, E., Boulo, V., Liu, Z.J., Gross, P.S., Cunningham, C., Cupit, P.M., Tanguy, A., Guo, X., Moraga, D., Boutet, I., Huvet, A., de Guise, S., Almeida, J.S. and Warr, G.W. (2007). A cDNA

- microarray for *Crassostrea virginica* and *C. gigas*. *Mar. Biotechnol.*; 9 (5): 577-591.
- Kang, Y.S., Kim, Y.M., Park, K.I., Kim Cho, S., Choi, K.S. and Cho, M. (2006) Analysis of EST and lectin expressions in haemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Dev. Comp. Immunol.*; 30: 1119-1131.
- Kennelly, P.J. (2001). Protein phosphatases: a phylogenetic perspective. *Chem. Rev.*; 101 (8): 2291-2312.
- Kennelly, P.J. (2003). Archaeal protein kinases and protein phosphatases: insights from genomics and biochemistry. *Biochem. J.*; 370 (Pt 2): 373-389.
- Kim, H.G. (2006). Chapter 25: Mitigation and Controls of HABs, pp. 327-338. En: "Ecology of Harmful Algae", editado por Granéli, E. and Turner, J.T. Ecological Studies, Vol. 189, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (Germany). ISBN: 978-3540-322092.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*; 16 (2): 111-120.
- Kira, S., Hayatshu, H. and Ogata, M. (1989). Detection of mutagenicity in mussel and their ambient water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*; 43: 583-589.
- Koehn, R.K. (1991). The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus*. *Aquaculture*; 94 (2-3): 125-145.
- Konoki, K., Onoda, T., Watanabe, R., Cho, Y., Kaga, S., Suzuki, T. and Yotsu-Yamashita, M. (2013). *In vitro* acylation of okadaic acid in the presence of various bivalves' extracts. *Mar. Drugs*; 11 (2): 300-315.

- Korsnes, M.S. and Espenes, A. (2011). Yessotoxin as an apoptotic inducer. *Toxicon*; 57 (7-8): 947-958.
- Kourtidis, A. and Scouras, Z.G. (2005). Analysis and characterization of the transcriptional unit of new *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia) HSP70 gene. *DNA Seq.*; 16 (1): 36-43.
- Krieger, R.I., Gee, S.J. and Lim, L.O. (1981). Marine bivalves, particularly mussels, *Mytilus* sp., for assessment of environmental quality. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*; 5 (1): 72-86.
- La Barre, S. and Kornprobst, J.M. (2014). "Outstanding Marine Molecules: Chemistry, Biology, Analysis". Wiley Blackwell-VCH, Weinheim (Germany). ISBN: 978-3-527-33465-0.
- Lacroix, C., Coquillé, V., Guyomarch, J., Auffret, M. and Moraga, D. (2014). A selection of reference genes and early-warning mRNA biomarkers for environmental monitoring using *Mytilus* spp. as sentinel species. *Mar. Pollut. Bull.*; 86 (1-2): 304-313.
- Lehane, L. (2001). Paralytic shellfish poisoning: a potential public health problem. *Med. J. Aust.*; 175 (1): 29-31.
- Lehane, L. and Lewis, R.J. (2000). Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int. J. Food Microbiol.*; 61 (2-3): 91-125.
- Leira, F., Alvarez, C., Vieites, J.M., Vieytes, M.R. and Botana, L.M. (2001). Study of cytoskeletal changes induced by okadaic acid in BE(2)-M17 cells by means of a quantitative fluorimetric microplate assay. *Toxicol. In Vitro*; 15: 277-282.
- Li, Q., Zhao, X., Kong, L. and Yu, H. (2013). Transcriptomic response to stress in marine bivalves. *ISJ*; 10: 84-93.

- Lin S. (2011). Genomic understanding of dinoflagellates. *Res. Microbiol.*; 162 (6): 551-569.
- Lin, Q., Buckler, E.S., Muse, S.V. and Walker, J.C. (1999). Molecular evolution of type 1 serine/threonine protein phosphatases. *Mol. Phylogenet. Evol.*; 12 (1): 57-66.
- Lindquist, S. and Craig, E.A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*; 22 (1): 631-677.
- Liu, D., Pan, L., Li, Z., Cai, Y. and Miao, J. (2014). Metabolites analysis, metabolic enzyme activities and bioaccumulation in the clam *Ruditapes philippinarum* exposed to benzo[a]pyrene. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*; 107: 251-259.
- Livingstone, D. R. (1992A). Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates. In: R. Gilles Eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (Germany). *Adv. Comp. Environ. Phys.*; 7: 45-185.
- Livingstone, D.R., and Pipe, R.K. (1992B). Mussels and environmental contaminants: molecular and cellular aspects. *Dev. Aquac. Fish. Sci.*; 25: 424-464.
- Lloyd, J.K., Duchin, J.S., Brochert, J., Quintana, H.F. and Robertson, A. (2011). Diarrhetic shellfish poisoning. *Emerg. Infect. Dis.*; 19 (8): 1314-1316.
- Lockwood, B.L. and Somero, G.N. (2011) Transcriptomic responses to salinity stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*). *Mol. Ecol.*; 20: 517-529.

- Lombet, A., Bidard, J.N. and Lazdunski, M. (1987). Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na<sup>+</sup> channel. *FEBS Letters*; 219 (2): 355-359.
- Lozano, V.; Martínez-Escauriaza, R.; Bernardo-Castiñeira, C.; Mesías-Gansbiller, C.; Pazos, A.J.; Sánchez, J.L. and Pérez-Parallé, M.L. (2014). A novel class of *Pecten maximus* POU gene, PmaPOU-IV: characterization and expression in adult tissues. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*; 453: 154-161.
- Luan, S. (2003). Protein phosphatases in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.*; 54: 63-92.
- Luu, H.A., Chen, D.Z., Magoon, J., Worms, J., Smith, J. and Holmes, C.F. (1993). Quantification of diarrhetic shellfish toxins and identification of novel protein phosphatase inhibitors in marine phytoplankton and mussels. *Toxicon*; 31 (1): 75-83.
- MacKenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A. and Suzuki, T. (2002). Complex toxin profiles in phytoplankton and Greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon*; 40 (9): 1321-1330.
- MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente), 2012. [www.magrama.gob.es/app/jacumar/datos\\_produccion/Documentos/Especies/CCAA/GALICIA\\_PRODUCION\\_MEJILLON\\_MEDITERRANEO.pdf](http://www.magrama.gob.es/app/jacumar/datos_produccion/Documentos/Especies/CCAA/GALICIA_PRODUCION_MEJILLON_MEDITERRANEO.pdf)
- Manfrin, C., Dreos, R., Battistella, S., Beran, A., Gerdol, M., Varotto, L., Lanfranchi, G., Venier, P. and Pallavicini, A. (2010). Mediterranean mussel gene expression profile induced by okadaic acid exposure. *Environ. Sci. Technol.*; 44 (21): 8276-8283.



- Marigómez, I., Zorita, I., Izagirre, U., Ortiz-Zarragoitia, M., Navarro, P., Etxebarria, N., Orbea, A., Soto, M. and Cajaraville, M.P. (2013). Combined use of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the integrative biomarker approach. *Aquat. Toxicol.*; 136-137: 32-48.
- Masoudi-Nejad, A., Tonomura, K., Kawashima, S., Moriya, Y., Suzuki, M., Itoh, M., Kanehisa, M., Endo, T., and Goto, S. (2006). EGAssembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. *Nucleic Acids Res.*; 34 (suppl 2), W459-W462.
- McNamee, S.E., Elliott, C.T., Greer, B., Lochhead, M. and Campbell, K. (2014). Development of a planar waveguide microarray for the monitoring and early detection of five harmful algal toxins in water and cultures. *Environ. Sci. Technol.*; 48 (22): 13340-13349.
- Mesías-Gansbiller, C.; Sánchez, J.L.; Pazos, A.J.; Lozano, V.; Martínez-Escauriaza, R. and Luz Pérez-Parallé, M. (2012). Conservation of Gbx genes from EHG homeobox in bivalve molluscs. *Mol. Phylogenet. Evol.*; 63 (1): 213-217.
- Miranda, F. (1998). “El sector del mejillón en Galicia, Análisis cuantitativo y síntesis estratégica.” Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Mitta, G., Hubert, F., Noel, T. and Roche, P. (1999). Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Europ. J. Biochem.*; 265: 71-78.

- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Noel, T., Romestand, B., Beauvillain, J.C., Salzet, M. and Roch, P. (2000). Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. *J. Cell Sci.*; 113: 2759-2769.
- Mohamed, B., Hajer, A., Susanna, S., Caterina, O., Flavio, M., Hamadi, B. and Aldo, V. (2014). Transcriptomic responses to heat stress and nickel in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*; 48: 104-112.
- Mons, M.N., Van Egmond, H.P. and Speijers, G.J.A. (1998). Paralytic shellfish poisoning: a review. Report n° 388802005, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM) of Bilthoven (Netherlands).
- Moorhead, G.B., De Wever, V., Templeton, G. and Kerk, D. (2009). Evolution of protein phosphatases in plants and animals. *Biochem. J.*; 417 (2): 401-409.
- Moroño, A., Arévalo, F., Fernández, M.L., Maneiro, J., Pazos, Y., Salgado, C. and Blanco, J. (2003) Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*. *Aquat. Toxicol.*; 62 (4): 269-80.
- Munday, R. (2013). Is protein phosphatase inhibition responsible for the toxic effects of okadaic acid in animals? *Toxins*; 5 (2): 267-285.
- Munday, R. and Reeve, J. (2013). Risk assessment of shellfish toxins. *Toxins (Basel)*; 5 (11): 2109-2137.
- Muramatsu, I., Uemera, D., Fujiwara, M. and Narahashi, T. (1984). Characteristics of palytoxin-induced depolarization in squid axons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; 231 (3): 488-94.

- Murrell, B., Wertheim, J.O., Moola, S., Weighill, T., Scheffler, K. and Pond, S.L.K. (2012). Detecting individual sites subject to episodic Diversifying Selection. *PLoS Genet.*; 8 (7): e1002764.
- Mustelin, T. (2007). A brief introduction to the protein phosphatase families. *Methods Mol. Biol.*; 365: 9-22.
- Nagao, M., Shima, H., Nakayasu, M. and Sugimura, T. (1995). Protein serine/threonine phosphatases as binding proteins for okadaic acid. *Mutat. Res.*; 333 (1-2): 173-179.
- Narbonne, J.F., Daubeze, M., Clerandau, C. and Garrigues, P. (1999). Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers*; 4: 415-424.
- OESA (Observatorio Español de Acuicultura), Anuario 2011, 192 pp. [www.fundacionoesa.es/images/stories/publicaciones/libros/anuario\\_2011\\_web.pdf](http://www.fundacionoesa.es/images/stories/publicaciones/libros/anuario_2011_web.pdf)
- Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimaloto, M., Naoki, H. and Yasumoto, T. (1999). Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon*; 37 (1): 55-65.
- Paz, B., Daranas, A.H., Norte, M., Riobó, P., Franco, J.M. and Fernández, J.J. (2008). Yessotoxins, a group of marine polyether toxins: an overview. *Mar. Drugs*; 6 (2): 73-102.
- Pereira, S.M.; Fernández-Tajes, J.; Rábade, T.; Flórez-Barrós, F.; Laffon, B. and Méndez, J. (2011). Comparison between two bivalves species as tool for the assessment of pollution levels in an estuarian environment. *J. Toxicol. Environ. Health A*; 74 (15-16): 1020-1029.

- Pérez-Camacho, A., González, R. and Fuentes, J. (1991). Mussel culture in Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture*; 94 (2-3): 263-278.
- Pettersson, L.H. and Pozdnyakov, D. (2013). “Monitoring of harmful algal blooms”. Springer-Praxis Books in Geophysical Sciences. ISBN: 978-3-540-682097.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*; 30 (9): e36.
- Philipp, E.E., Kraemer, L., Melzner, F., Poustka, A.J., Thieme, S., Findeisen, U., Schreiber, S. and Rosenstiel, P. (2012). Massively parallel RNA sequencing identifies a complex immune gene repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS One*; 7: e33091.
- Pond, S.L.K., Frost, S.D.W. and Muse, S.V. (2005). HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics*; 21 (5): 676-679.
- Ponting, C.P., Aravind, L., Schultz, J., Bork, P. and Koonin, E.V. (1999). Eukaryotic signaling domain homologues in Archaea and Bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer. *J. Mol. Biol.*; 289 (4): 729-745.
- Poon, A.F., Frost, S.D. and Pond, S.L. (2009). Detecting signatures of selection from DNA sequences using Datamonkey. *Methods Mol. Biol.*; 537: 163-183.
- Poynton, H.C., Robinson, W.E., Blalock, B.J. and Hannigan, R.E. (2014). Correlation of transcriptomic responses and metal bioaccumulation in *Mytilus edulis* L. reveals early indicators of stress. *Aquat. Toxicol.*; 155: 129-41.

- Prado-Álvarez, M., Flórez-Barrós, F., Sexto-Iglesias, A.; Méndez, J. and Fernandez-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.
- Prado-Álvarez, M., Flórez-Barrós, F., Méndez, J. and Fernandez-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 (3): 189-197.
- Prassopoulou, E., Katikou, P., Georgantelis, D. and Kyritsakis, A. (2009). Detection of okadaic acid and related esters in mussels during diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episodes in Greece using the mouse bioassay, the PP2A inhibition assay and HPLC with fluorimetric detection. *Toxicon*; 53 (2): 214-27.
- Pulido, O.M. (2008). Domoic acid toxicologic pathology: a review. *Mar. Drugs*; 6 (2): 180-219.
- Quilang, J., Wang, S., Li, P., Abernathy, J., Peatman, E., Wang, Y., Wang, L., Shi, Y., Wallace, R., Guo, X. and Liu, Z. (2007). Generation and analysis of ESTs from the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin and identification of microsatellite and SNP markers. *BMC Genomics*; 8: 157-168.
- Quilliam, M.A. (1995). Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.*; 78 (2): 555-570.
- Ramos, V. and Vasconcelos, V. (2010). Palytoxin and analogs: biological and ecological effects. *Mar. Drugs*; 8 (7): 2021-2037.

- Ramsey, U.P., Douglas, D.J., Walter, J.A. and Wright, J.L. (1998). Biosynthesis of domoic acid by the diatom *Pseudo-nitzschia* multiseriis. *Nat. Toxins*; 6 (3-4): 137-146.
- Rinkevich, B. (2005). Marine invertebrate cell cultures: new millennium trends. *Mar. Biotechnol.*; 7: 429–439.
- Riobó, P. and Franco, J.M. (2011). Palytoxins: biological and chemical determination. *Toxicon*; 57 (3): 368-375.
- Robledo, Y. and Cajaraville, M.P. (1997). Isolation and morphofunctional characterization of mussel digestive gland cells *in vitro*. *Eur. J. Cell Biol.*; 72 (4): 362-369.
- Rodríguez, F., Oliver, J.L., Marín, A., and Medina, J.R. (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theoret. Biol.*; 142 (4): 485–501.
- Ronne, H., Carlberg, M., Hu, G.Z. and Nehlin, J.O. (1991). Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis. *Mol. Cell Biol.*; 11 (10): 4876-84.
- Rossignoli, A.E. and Blanco, J. (2010). Subcellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*: first evidences of lipoprotein binding to okadaic acid. *Toxicon*; 55 (2-3): 221-6.
- Rossignoli, A.E., Fernández, D., Regueiro, J., Mariño, C. and Blanco, J. (2011). Esterification of okadaic acid in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*; 57 (5): 712-20.
- Rossini, G.P. and Bigiani, A. (2011). Palytoxin action on the Na<sup>(+)</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase and the disruption of ion equilibria in biological systems. *Toxicon*; 57 (3): 429-39.

- Rossini, G.P. and Hess, P. (2010). Phycotoxins: chemistry, mechanisms of action and shellfish poisoning. *EXS*; 100: 65-122.
- Saavedra, C. and Bachère, E. (2006) Bivalve genomics. *Aquaculture*; 256: 1-14.
- Salazar, C. and Höfer, T. (2009). Multisite protein phosphorylation--from molecular mechanisms to kinetic models. *FEBS J.*; 276 (12): 3177-98.
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A.N. and Sarker, S. (2006). Molecular Biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*; 15 (4): 333-40.
- Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K. J., Furey, A., McMahon, T., Silke, J. and Yasumoto, T. (1998). Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from Irish mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.*; 120 (38): 9967-9968.
- Schantz, E.J. (1986). Chemistry and biology of saxitoxin and related toxins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 479: 15-23.
- Schmitt, C. and De Haro, L. (2013). Clinical marine toxicology: a European perspective for clinical toxicologists and poison centers. *Toxins (Basel)*; 5 (8): 1342-1352.
- Scoging, A.C. (1998). Marine biotoxins. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.*; 27: 41S-50S.
- Sedmak, B. and Fanuko, N. (1991). Occurrence of *Dinophysis* spp. and toxic shellfish in the Northern Adriatic. *J. Appl. Phycol.*; 3: 289-294.

- Sellner, K.G., Doucette, G.J. and Kirkpatrick, G.J. (2003). Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*; 30 (7): 383-406.
- Sents, W., Ivanova, E., Lambrecht, C., Haesen, D. and Janssens, V. (2013). The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity. *FEBS J.*; 280 (2): 644-661.
- Shi, Y. (2009). Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*; 139 (3): 468-484.
- Shimizu, Y. (1984). Paralytic shellfish poisons. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*; 45: 235-264.
- Shumway, S. E. (1995). Phycotoxin related shellfish poisoning: bivalve molluscs are not the only vectors. *Rev. Fish. Sci.*; 3 (1): 1-31.
- Si Quang, L., Gascuel, O. and Lartillot, N. (2008). Empirical profile mixture models for phylogenetic reconstruction. *Bioinformatics*; 24 (20): 2317-2323.
- Smienk, H.G., Calvo, D., Razquin, P., Domínguez, E. and Mata, L. (2012). Single laboratory validation of a ready-to-use phosphatase inhibition assay for detection of okadaic acid toxins. *Toxins (Basel)*; 4 (5): 339-352.
- Smith, R.D. and Walker, J.C. (1993). Expression of multiple type 1 phosphoprotein phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.*; 21 (2): 307-316.
- Sneddon, A.A., Cohen, P.T. and Stark, M.J. (1990). *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A performs an essential cellular function and is encoded by two genes. *EMBO J.*; 9 (13): 4339-4346.



- Somerville, C.C., Knight, I.T., Straube, W.L. and Colwell, R.R. (1989). Simple, rapid method for direct isolation of nucleic acids from aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.*; 55 (3): 548-554.
- Song, L., Xu, W., Li, C., Li, H., Wu, L., Xiang, J. and Guo, X. (2006). Development of expressed sequence tags from the bay scallop *Argopecten irradians irradians*. *Mar. Biotechnol.*; 8: 161-169.
- Spector, I., Braet, F., Shochet, N. R. and Bubb, M. R. (1999). New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microsc. Res. Tech.*; 47 (1): 18-37.
- Štambuk, A., Šrut, M., Šatović, Z., Tkalec, M. and Klobučar, G.I. (2013). Gene flow vs. pollution pressure: genetic diversity of *Mytilus galloprovincialis* in eastern Adriatic. *Aquat. Toxicol.*; 136-137: 22-31.
- Suárez-Ulloa, V., Fernández-Tajes, J., Aguiar-Pulido, V., Rivera-Casas, C., González-Romero, R., Ausio, J., and Eirín-López, J.M. (2013A). 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*. *Mar. Drugs*; 11 (3): 830-841.
- Suárez-Ulloa, V., Fernández-Tajes, J., Manfrin, C., Gerdol, M., Venier, P. and Eirín-López, J.M. (2013B). Bivalve omics: state of the art and potential applications for the biomonitoring of harmful marine compounds. *Mar. Drugs*; 11 (11): 4370-4389.
- Sun, X.X., Han, K.N., Choi, J.K. and Kim, E.K. (2004). Screening of surfactants for harmful algal blooms mitigation. *Mar. Pollut. Bull.*; 48 (9-10): 937-45.

- Suzuki, T. and Quilliam, M.A. (2011). LC-MS/MS analysis of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins, okadaic acid and dinophysistoxin analogues, and other lipophilic toxins. *Anal. Sci.*; 27 (6): 571-584.
- Suzuki, T., Yoshizawa, R., Kawamura, T. and Yamasaki, M. (1996). Interference of free fatty acids from the hepatopancreas of mussels with the mouse bioassay for shellfish toxins. *Lipids*; 31 (6): 641-645.
- Svensson, S. (2003). Depuration of Okadaic acid (Diarrhetic Shellfish Toxin) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus), feeding on different quantities of nontoxic algae. *Aquaculture*; 218 (1): 277-291.
- Svensson, S., and Förlin, L. (2004). Analysis of the importance of lipid breakdown for elimination of okadaic acid (diarrhetic shellfish toxin) in mussels, *Mytilus edulis*: results from a field study and a laboratory experiment. *Aquat. Toxicol.*; 66 (4): 405-418.
- Takai, A., Murata, M., Torigoe, K., Isobe, M., Mieskes, G. and Yasumoto, T. (1992). Inhibitory effect of okadaic acid derivatives on protein phosphatases. A study on structure-affinity relationship. *Biochem. J.*; 284 (Pt 2): 539-544.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*; 30 (12): 2725-2729.
- Tanguy, A., Bierne, N., Saavedra, C., Pina, B., 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.F., Zouros, E. and 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 (1-2): 27-36.
- Tanguy, A., Guo, X. and Ford, S.E. (2004). Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene*; 338: 121-131.
- Tanguy, M., McKenna, P., Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Danger, J-M. and Siah, A. (2013). Sequencing analysis of a normalized cDNA library of *Mytilus edulis* hemocytes exposed to *Vibrio splendidus* LGP32 strain. *Results in Immunol.*; 3: 40-50.
- Terao, K., Ito, E., Yanagi, T. and Yasumoto, T. (1986). Histopathological studies on experimental marine toxin poisoning. I. Ultrastructural changes in the small intestine and liver of suckling mice induced by dinophysistoxin-1 and pectenotoxin-1. *Toxicon*; 24 (11-12): 1141-1151.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*; 22 (22): 4673-4680.
- Tripuraneni, J., Koutsouris, A., Pestic, L., De Lanerolle, P. and Hecht, G. (1997). The toxin of diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, increases intestinal epithelial paracellular permeability. *Gastroenterology*; 112 (1): 100-108.
- Tubaro, A., Dell'ovo, V., Sosa, S. and Florio, C. (2010). Yessotoxins: a toxicological overview. *Toxicon*; 56 (2): 163-172.
- Tubaro, A., Florio, C., Luxich, E., Sosa, S., Della Loggia, R. and Yasumoto, T. (1996). A protein phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive

- assessment of okadaic acid contamination in mussels. *Toxicon*; 34 (7): 743-752.
- Twiner, M.J., Rehmann, N., Hess, P. and Doucette, G.J. (2008). Azaspiracid shellfish poisoning: a review on the chemistry, ecology, and toxicology with an emphasis on human health impacts. *Mar. Drugs*; 6 (2): 39-72.
- Underman, A.E. and Leedom, J.M. (1993). Fish and shellfish poisoning. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.*; 13: 203-225.
- Valdiglesias, V., Prego-Faraldo, M.V., Pásaro, E., Méndez, J. and Laffon, B. (2013). Okadaic acid: more than a diarrhetic toxin. *Mar. Drugs*; 11 (11): 4328-4349.
- Vale, P. (2010). Profiles of fatty acids and 7-O-acyl okadaic acid esters in bivalves: can bacteria be involved in acyl esterification of okadaic acid? *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*; 151 (1): 18-24.
- Van der Lelie, D., Corbisier, P., Baeyens, W., Wuertz, S., Diels, L. and Mergeay, M. (1994). The use of biosensors for environmental monitoring. *Res. Microbiol.*; 145 (1): 67-74.
- Van Dolah, F.M. (2000). Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environ. Health Perspect.*; 108 (Suppl 1): 133-141.
- Van Egmond, H.P., Aune, T., Lassus, P., Speijers, G.J.A. and Waldock, M. (1993). Paralytic and diarrhetic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J. Nat. Toxins*; 2: 41-83.
- Vandegheuchte, M.B. and Janssen, C.R. (2014). Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*; 764-765: 36-45.

- Vandesompele, J., de Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*; 3 (7): RESEARCH0034.
- Venier, P., De Pittà, C., Pallavicini, A., Marsano, F., Varotto, L., Romualdi, C., Dondero, F., Viarengo, A. and Lanfranchi, G. (2006). Development of mussel mRNA profiling: Can gene expression trends reveal coastal water pollution? *Mutat. Res.*; 602 (1-2): 121-134.
- Venier, P., Pallavicini, A., De Nardi, B. and Lanfranchi, G. (2003B). Towards a catalogue of genes transcribed in multiples tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Gene*; 314: 29-40.
- Venier, P., Tallandini, L. and Bisol, P. (2003A). Characterization of coastal sites by applying genetic and genotoxicity markers in *Mytilus galloprovincialis* and *Tapes philippinarum*. *Chem. Ecol.*; 19: 113-128.
- Venier, P., De Pittà, C., Bernante, F., Varotto, L., De Nardi, B., Bovo, G. and Lanfranchi, G. (2009). MytiBase: a knowledgebase of mussel (*M. galloprovincialis*) transcribed sequences. *BMC Genomics*, 10 (1): 72.
- Venier, P., Varotto, L., Rosani, U., Millino, C., Celegato, B., Bernante, F., Lanfranchi, G., Novoa, B., Roch, P., Figueras, A. and Pallavicini, A. (2011). Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics*; 12 (1): 69.
- Viarengo, A. and Canesi, L. (1991). Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*; 94 (2-3): 225-243.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E. and Koehler, A. (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of

- pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*; 146 (3): 281-300.
- Vieites, J.M., Leira, F., Botana, L.M. and Vieytes, M.R. (1996). Determination of DSP toxins: comparative study of HPLC and bioassay to reduce the observation time of the mouse bioassay. *Arch. Toxicol.*; 70 (7): 440-443.
- Vilariño, N., Louzao, M.C., Vieytes, M.R. and Botana, L.M. (2010). Biological methods for marine toxin detection. *Anal. Bioanal. Chem.*; 397 (5): 1673-1681.
- Virshup, D.M. and Shenolikar, S. (2009). From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol. Cell.*; 33 (5): 537-545.
- Viviani, R. (1992). Eutrophication, marine biotoxins, human health. *Sci. Total Environ.*; Suppl: 631-662.
- Wang, D.Z. (2008). Neurotoxins from marine dinoflagellates: a brief review. *Mar. Drugs*; 6 (2): 349-371.
- Watkins, S.M., Reich, A., Fleming, L.E. and Hammond, R. (2008). Neurotoxic shellfish poisoning. *Mar. Drugs*; 6 (3): 431-455.
- Welch, W.J. (1993). How cells respond to stress. *Sci. Am.*; 268: 56-62.
- Widdows, J., Fieth, P. and Worrall, C.M. (1979). Relationships between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*; 50 (3): 195-207.
- Wiese, M., D'Agostino, P.M., Mihali, T.K., Moffitt, M.C. and Neilan, B.A. (2010). Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Mar. Drugs*; 8 (7): 2185-2211.

- Wong, J.T. and Kwok, A.C. (2005). Proliferation of dinoflagellates: blooming or bleaching. *Bioessays*; 27 (7): 730-740.
- Wright, J.L.C. and Cembella, A.D. (1998). Ecophysiology and biosynthesis of polyether marine biotoxins, pp. 427-52. En: "Physiological ecology of harmful algal blooms", editado por Anderson, D.M., Cembella, A.D. and Hallegraeff, G.M. Springer-Verlag, NATO ASI Series / Ecological Sciences (n° 41), Heidelberg (Germany). ISBN: 978-3540641179.
- Wright, J.L.C., Bird, C.J., de Freitas, A.S., Hampson, D., McDonald, J. and Quilliam, M.A. (1990). Chemistry, biology, and toxicology of domoic acid and its isomers. *Can. Dis. Wkly. Rep.*; 16 (Suppl 1E): 21-26.
- Xing, Y., Xu, Y., Chen, Y., Jeffrey, P.D., Chao, Y., Lin, Z., Li, Z., Strack, S., Stock, J.B. and Shi, Y. (2006). Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell*; 127 (2): 341-353.
- Xu, Y., Xing, Y., Chen, Y., Chao, Y., Lin, Z., Fan, E., Yu, J.W., Strack, S., Jeffrey, P.D. and Shi, Y. (2006). Structure of the protein phosphatase 2A holoenzyme. *Cell*; 127 (6): 1239-1251.
- Yang, S.H., Kang, S.M., Lee, K.B., Chung, T.D., Lee, H., and Choi, I.S. (2011). Mussel-inspired encapsulation and functionalization of individual yeast cells. *J. Amer. Chem. Soc.*, 133 (9): 2795-2797.
- Zhang, L., Gan, J., Ke, C., Liu, X., Zhao, J., You, L., Yu, J. and Wu, H. (2012). Identification and expression profile of a new cytochrome P450 isoform (CYP414A1) in the hepatopancreas of *Venerupis (Ruditapes) philippinarum* exposed to benzo[ $\alpha$ ]pyrene, cadmium and copper. *Environm. Toxicol. Pharmac.*; 33: 85-91.

Zouros, E., Oberhauser Ball, A., Saavedra, C. and Freeman, K.R. (1994). An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 91: 7463-7467.

Zuykov, M., Pelletier, E. and Harper, D.A. (2013). Bivalve mollusks in metal pollution studies: from bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere*; 93 (2): 201-208.



# ANEXOS



**Tabla Anexa 01.** Números de acceso de GenBank para las 143 secuencias nucleotídicas de las subunidades catalíticas de PP1 usadas en el análisis filogenético de este trabajo.

GRUPO TAXONÓMICO	ESPECIES	GENES	NUCLEOTIDE ACCESS NUMBERS
<b>Deuteróstomos</b>			
Mamíferos			
	<i>Homo sapiens</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma-1 PP1 gamma-2	<a href="#">gi 45827796</a> <a href="#">gi 46249374</a> <a href="#">gi 332688253</a> <a href="#">gi 350276246</a>
	<i>Pan troglodytes</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 410045452</a> <a href="#">gi 332812852</a> <a href="#">gi 410047273</a>
	<i>Pongo abelii</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 395742376</a> <a href="#">gi 197101288</a> <a href="#">gi 395744842</a>
	<i>Nomascus leucogenys</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 441608024</a> <a href="#">gi 332227084</a> <a href="#">gi 441629892</a>
	<i>Macaca mulatta</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 297267306</a> <a href="#">gi 402765835</a> <a href="#">gi 383872247</a>
	<i>Mus musculus</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma-1 PP1 gamma-2	<a href="#">gi 133892519</a> <a href="#">gi 161484667</a> <a href="#">gi 568936933</a> <a href="#">gi 568936923</a>

	<i>Rattus norvegicus</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma-1 PP1 gamma-2	<a href="#">gi 13928709</a> <a href="#">gi 40254786</a> <a href="#">gi 401709957</a> <a href="#">gi 401709958</a>
	<i>Cavia porcellus</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma-1 PP1 gamma-2	<a href="#">gi 514458130</a> <a href="#">gi 514466982</a> <a href="#">gi 514447627</a> <a href="#">gi 514447625</a>
	<i>Ochotona princeps</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 504178440</a> <a href="#">gi 504140618</a> <a href="#">gi 504171543</a>
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 1534</a> <a href="#">gi 156119415</a> <a href="#">gi 655874320</a>
	<i>Canis lupus familiaris</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma-1 PP1 gamma-2	<a href="#">gi 50978727</a> <a href="#">gi 50978671</a> <a href="#">gi 545543256</a> <a href="#">gi 50978669</a>
	<i>Mustela putorius furo</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 511879250</a> <a href="#">gi 511916502</a> <a href="#">gi 511960180</a>
	<i>Odobenus rosmarus divergens</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 472348384</a> <a href="#">gi 472350420</a> <a href="#">gi 472352454</a>
	<i>Leptonychotes weddellii</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 585196522</a> <a href="#">gi 585180134</a> <a href="#">gi 585170034</a>

	<i>Bos taurus</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma-1 PP1 gamma-2	<a href="#">gi 402744219</a> <a href="#">gi 77736256</a> <a href="#">gi 528988488</a> <a href="#">gi 115432045</a>
	<i>Sus scrofa</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 113205689</a> <a href="#">gi 90017493</a> <a href="#">gi 113205693</a>
	<i>Orcinus orca</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 466049589</a> <a href="#">gi 466000174</a> <a href="#">gi 466043253</a>
	<i>Orycteropus afer afer</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 634858880</a> <a href="#">gi 634842550</a> <a href="#">gi 634840726</a>
	<i>Elephantulus edwardii</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 585656123</a> <a href="#">gi 585640839</a> <a href="#">gi 585691354</a>
	<i>Chrysochloris asiatica</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 586460520</a> <a href="#">gi 586452629</a> <a href="#">gi 586469766</a>
Aves			
	<i>Gallus gallus</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 45426646</a> <a href="#">gi 45384111</a> <a href="#">gi 57525186</a>
	<i>Pseudopodoces humilis</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 543371568</a> <a href="#">gi 543379133</a> <a href="#">gi 543361863</a>
Reptiles			
	<i>Chrysemys picta bellii</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 641754110</a> <a href="#">gi 641752951</a> <a href="#">gi 641796997</a>

	<i>Anolis carolinensis</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 637248679</a> <a href="#">gi 637257873</a> <a href="#">gi 637349723</a>
Anfibios			
	<i>Xenopus laevis</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 147903538</a> <a href="#">gi 148224493</a> <a href="#">gi 147900807</a>
	<i>Xenopus tropicalis</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 187607124</a> <a href="#">gi 58332785</a> <a href="#">gi 89886071</a>
Peces			
	<i>Danio rerio</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 212724123</a> <a href="#">gi 123858771</a> <a href="#">gi 326667501</a>
	<i>Takifugu rubripes</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 410895664</a> <a href="#">gi 410898171</a> <a href="#">gi 410922300</a>
	<i>Oreochromis niloticus</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 542181917</a> <a href="#">gi 542202175</a> <a href="#">gi 542196729</a>
	<i>Oryzias latipes</i>	PP1 alpha PP1 beta PP1 gamma	<a href="#">gi 432922690</a> <a href="#">gi 432936725</a> <a href="#">gi 432875391</a>
Urocordados			
	<i>Ciona intestinalis</i>	PP1	<a href="#">gi 198423689</a>
Equinodermos			
	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	PP1 alpha PP1 beta	<a href="#">gi 390346178</a> <a href="#">gi 390333524</a>

Hemicordados			
	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>	PP1 alpha PP1 beta	<a href="#">gi 585657269</a> <a href="#">gi 585665068</a>
Protóstomos			
Artrópodos			
	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	PP1 alpha PP1 beta	<a href="#">gi 641660806</a> <a href="#">gi 641650970</a>
	<i>Tribolium castaneum</i>	PP1 alpha PP1 beta	<a href="#">gi 642925276</a> <a href="#">gi 642921257</a>
	<i>Drosophila melanogaster</i>	PP1 alpha-a PP1 alpha-b PP1 (flw-b) PP1 (flw-c)	<a href="#">gi 442620911</a> <a href="#">gi 442620912</a> <a href="#">gi 442615784</a> <a href="#">gi 442615785</a>
	<i>Apis mellifera</i>	PP1 alpha PP1 beta	<a href="#">gi 571514733</a> <a href="#">gi 571548627</a>
	<i>Nasonia vitripennis</i>	PP1 alpha PP1 beta	<a href="#">gi 645009983</a> <a href="#">gi 645020006</a>
Moluscos			
	<i>Aplysia californica</i>	PP1 alpha PP1 beta	<a href="#">gi 524912620</a> <a href="#">gi 524893877</a>
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	PP1_CAT_alpha PP1_CAT_beta	
Nemátodos			
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	PP1 (Gsp-1) PP1 (Gsp-2)	<a href="#">gi 392920452</a> <a href="#">gi 392895513</a>
	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	PP1 (Gsp-1) PP1 (Gsp-2)	<a href="#">gi 268558351</a> <a href="#">gi 268530131</a>
Plantas			
Plantas terrestres			
	<i>Oryza sativa Japonica</i>	PP1	<a href="#">gi 115466603</a>
	<i>Zea mays</i>	PP1	<a href="#">gi 212274832</a>

	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PP1	<a href="#">gi 145340100</a>
	<i>Medicago truncatula</i>	PP1	<a href="#">gi 357512384</a>
	<i>Vitis vinifera</i>	PP1	<a href="#">gi 225426133</a>
	<i>Prunus mume</i>	PP1	<a href="#">gi 645267236</a>
<b>Algas verdes</b>			
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	PP1	<a href="#">gi 159487111</a>
<b>Hongos</b>			
	<i>Aspergillus flavus</i>	PP1	<a href="#">gi 238494633</a>
	<i>Candida tropicalis</i>	PP1	<a href="#">gi 255726883</a>
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PP1	<a href="#">gi 50421852</a>
	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	PP1	<a href="#">gi 303391366</a>
	<i>Magnaporthe oryzae</i>	PP1	<a href="#">gi 389632344</a>
	<i>Neurospora crassa</i>	PP1	<a href="#">gi 164428779</a>
	<i>Scheffersomyces stipitis</i>	PP1	<a href="#">gi 126139522</a>
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	PP1	<a href="#">gi 429240830</a>
	<i>Ustilago maydis</i>	PP1	<a href="#">gi 71017992</a>
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	PP1	<a href="#">gi 50543391</a>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PP1	<a href="#">gi 398364802</a>
<b>Protistas</b>			
	<i>Dictyostelium discoideum</i>	PP1	<a href="#">gi 66819964</a>
	<i>Plasmodium falciparum</i>	PP1	<a href="#">gi 124808445</a>
	<i>Trypanosoma brucei</i>	PP1	<a href="#">gi 71755936</a>
	<i>Leishmania infantum</i>	PP1	<a href="#">gi 146091730</a>
	<i>Giardia lamblia</i>	PP1	<a href="#">gi 159118984</a>
	<i>Guillardia theta</i>	PP1	<a href="#">gi 162606035</a>



**Tabla Anexa 02.** Números de acceso de GenBank para las 118 secuencias nucleotídicas de las subunidades catalíticas de PP2A usadas en el análisis filogenético de este trabajo.

GRUPO TAXONÓMICO	ESPECIES	GENES	NUCLEOTIDE ACCESS NUMBERS
<b>Deuteróstomos</b>			
Mamíferos			
	<i>Homo sapiens</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 57222566</a> <a href="#">gi 57222564</a>
	<i>Pan troglodytes</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 410056886</a> <a href="#">gi 410041668</a>
	<i>Gorilla gorilla</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 426349973</a> <a href="#">gi 426359275</a>
	<i>Pongo abelii</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 395736174</a> <a href="#">gi 395739558</a>
	<i>Nomascus leucogenys</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 441596693</a> <a href="#">gi 441621204</a>
	<i>Callithrix jacchus</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 390459639</a> <a href="#">gi 390473659</a>
	<i>Mus musculus</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 146134357</a> <a href="#">gi 119672926</a>
	<i>Rattus norvegicus</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 48675843</a> <a href="#">gi 8394020</a>
	<i>Cavia porcellus</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 514450862</a> <a href="#">gi 514470693</a>
	<i>Ochotona princeps</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 504148108</a> <a href="#">gi 504165600</a>

	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 156119339</a> <a href="#">gi 156119385</a>
	<i>Canis lupus familiaris</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 50978725</a> <a href="#">gi 345781564</a>
	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	PP2Aalpha	<a href="#">gi 301754286</a>
	<i>Mustela putorius furo</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 511969409</a> <a href="#">gi 511976322</a>
	<i>Odobenus rosmarus divergens</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 472372032</a> <a href="#">gi 472377827</a>
	<i>Bos taurus</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 31341810</a> <a href="#">gi 115495140</a>
	<i>Orcinus orca</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 466069771</a> <a href="#">gi 465983233</a>
	<i>Pteropus alecto</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 586536657</a> <a href="#">gi 586520727</a>
	<i>Trichechus manatus</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 471405951</a> <a href="#">gi 471401642</a>
	<i>Orycteropus afer</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 634856256</a> <a href="#">gi 634853279</a>
	<i>Elephantulus edwardii</i>	P P2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 585667157</a> <a href="#">gi 585652701</a>
	<i>Monodelphis domestica</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 611972937</a> <a href="#">gi 612029005</a>
Aves			
	<i>Gallus gallus</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 57525023</a> <a href="#">gi 45384107</a>
	<i>Zonotrichia albicollis</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 542149391</a> <a href="#">gi 542182252</a>

Reptiles			
	<i>Anolis carolinensis</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 637269274</a> <a href="#">gi 637332044</a>
Anfibios			
	<i>Xenopus laevis</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 148230508</a> <a href="#">gi 148234622</a>
	<i>Xenopus tropicalis</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 45361392</a> <a href="#">gi 53749697</a>
Peces			
	<i>Danio rerio</i>	PP2Alpha PP2Abeta	<a href="#">gi 528514591</a> <a href="#">gi 55742594</a>
	<i>Takifugu rubripes</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 410915101</a> <a href="#">gi 410922215</a>
	<i>Oreochromis niloticus</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 525343643</a> <a href="#">gi 542255813</a>
	<i>Oryzias latipes</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 432895680</a> <a href="#">gi 432960827</a>
	<i>Callorhinchus milii</i>	PP2Aalpha PP2Abeta	<a href="#">gi 632966554</a> <a href="#">gi 632975254</a>
Urocordados			
	<i>Ciona intestinalis</i>	PP2A	<a href="#">gi 459172841</a>
Equinodermos			
	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	PP2A	<a href="#">gi 390368460</a>
Protóstomos			
Artrópodos			
	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	PP2A	<a href="#">gi 209915624</a>
	<i>Tribolium castaneum</i>	PP2A	<a href="#">gi 642933469</a>
	<i>Anopheles gambiae</i>	PP2A	<a href="#">gi 158299220</a>
	<i>Drosophila melanogaster</i>	PP2A (mts)	<a href="#">gi 665404820</a>

	<i>Bombyx mori</i>	PP2A	<a href="#">gi 512906856</a>
	<i>Apis mellifera</i>	PP2A (mts)	<a href="#">gi 571536420</a>
	<i>Nasonia vitripennis</i>	PP2A	<a href="#">gi 645025559</a>
Moluscos			
	<i>Aplysia californica</i>	PP2A	<a href="#">gi 524887168</a>
	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	PP2A_CAT	
Nemátodos			
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	PP2A (let-92)	<a href="#">gi 392900980</a>
	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	PP2A (let-92)	<a href="#">gi 268536557</a>
<b>Plantas</b>			
Plantas terrestres			
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PP2A-1	<a href="#">gi 145336877</a>
		PP2A-2	<a href="#">gi 30681704</a>
		PP2A-3	<a href="#">gi 186507470</a>
		PP2A-4	<a href="#">gi 145339639</a>
		PP2A-5	<a href="#">gi 145337355</a>
	<i>Zea mays</i>	PP2A	<a href="#">gi 226494741</a>
		PP2A	<a href="#">gi 226490935</a>
		PP2A	<a href="#">gi 226495576</a>
	<i>Oryza sativa</i>	PP2A	<a href="#">gi 115445040</a>
		PP2A	<a href="#">gi 115468653</a>
		PP2A	<a href="#">gi 115481969</a>
		PP2A	<a href="#">gi 115450966</a>
	<i>Medicago truncatula</i>	PP2A	<a href="#">gi 358348143</a>
		PP2A	<a href="#">gi 357486392</a>
		PP2A	<a href="#">gi 357516622</a>

	<i>Vitis vinifera</i>	PP2A PP2A PP2A PP2A PP2A	<a href="#">gi 225435709</a> <a href="#">gi 359487441</a> <a href="#">gi 225456597</a> <a href="#">gi 359488757</a> <a href="#">gi 359473309</a>
	<i>Prunus mume</i>	PP2A PP2A PP2A PP2A	<a href="#">gi 645271954</a> <a href="#">gi 645215096</a> <a href="#">gi 645268754</a> <a href="#">gi 645229490</a>
<b>Algas verdes</b>			
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	PP2A	<a href="#">gi 159482736</a>
<b>Algas rojas</b>			
	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	PP2A	<a href="#">gi 544213572</a>
	<i>Galdieria sulphuraria</i>	PP2A	<a href="#">gi 545707153</a>
<b>Hongos</b>			
	<i>Aspergillus oryzae</i>	PP2A	<a href="#">gi 317136681</a>
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	PP2A	<a href="#">gi 50421202</a>
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	PP2A	<a href="#">gi 50310606</a>
	<i>Magnaporthe oryzae</i>	PP2A	<a href="#">gi 389628623</a>
	<i>Neurospora crassa</i>	PP2A	<a href="#">gi 164425031</a>
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	PP2A (Ppa1) PP2A (Ppa2)	<a href="#">gi 429242559</a> <a href="#">gi 429240420</a>
	<i>Ustilago maydis</i>	PP2A	<a href="#">gi 42741403</a>
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	PP2A	<a href="#">gi 50555975</a>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PP2A (Pph21) PP2A (Pph22)	<a href="#">gi 296143232</a> <a href="#">gi 296143183</a>
<b>Protistas</b>			
	<i>Dictyostelium discoideum</i>	PP2A	<a href="#">gi 66803952</a>

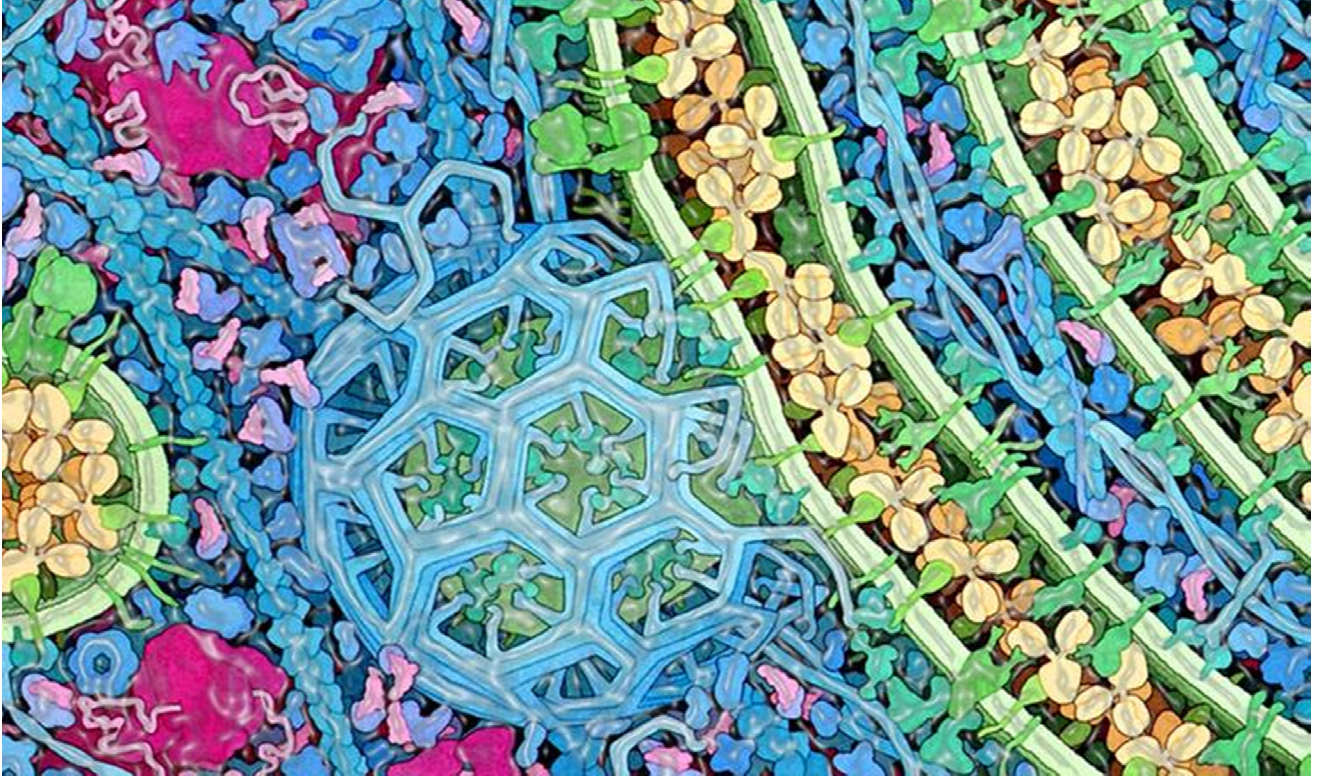
	<i>Trypanosoma brucei</i>	PP2A	<a href="#">gi 72386586</a>
	<i>Leishmania infantum</i>	PP2A	<a href="#">gi 146088863</a>
	<i>Giardia lamblia</i>	PP2A	<a href="#">gi 159114841</a>
	<i>Guillardia theta</i>	PP2A	<a href="#">gi 551647481</a>

**Anexo 03.** Documentación complementaria legislativa a los métodos actuales de cuantificación y detección de biotoxinas marinas.

- ♦ Requisitos legales y la presión social para evitar el uso de animales de experimentación [[http://aesan.msssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/legislacion\\_comunitaria/Directive\\_2010\\_63.pdf](http://aesan.msssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/legislacion_comunitaria/Directive_2010_63.pdf)], junto con la falta de fiabilidad de los resultados producidos por el método biológico [[http://aesan.msssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/legislacion\\_comunitaria/Commission\\_Regulation\\_15-2011.pdf](http://aesan.msssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/legislacion_comunitaria/Commission_Regulation_15-2011.pdf)] han llevado a la **prohibición del bioensayo en ratón**.
- ♦ Ensayo de inhibición de la fosfatasa. Página del *Laboratorio de Referencia de la Unión Europea de Biotoxinas Marinas*: <http://aesan.msssi.gob.es/CRLMB/web/home.shtml>.
- ♦ Resumen de los otros **procedimientos alternativos al bioensayo** permitidos (cromatografía LC-MS/MS) y ensayo de inhibición “complementario”: [http://aesan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/otros\\_procedimientos/other\\_crlmb\\_standard\\_operating\\_procedures.shtml](http://aesan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/otros_procedimientos/other_crlmb_standard_operating_procedures.shtml)
- ♦ **Metodología standard del análisis por LC-MS/MS** (método químico cuantitativo; límite de detección = 40 ug/kg; detecta también AZA1, PTX2 y YTX; **Julio 2011**): [http://aesan.msssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/metodos\\_analiticos\\_de\\_desarrollo/EU-Harmonised-SOP-LIPO-LCMSMS\\_Version4.pdf](http://aesan.msssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/metodos_analiticos_de_desarrollo/EU-Harmonised-SOP-LIPO-LCMSMS_Version4.pdf)
- ♦ **Metodología standard del bioensayo en ratón** (método biológico cualitativo; detecta también AZA, PTX y YTX; **Diciembre 2013**): <http://aesan.msssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/procedimientos/EU-Harmonised-Version6-December2013.pdf>







UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**XENOMAR**  
Genética de organismos marinos

