



TESIS DOCTORAL

**NEOPLASIA DISEMINADA EN
POBLACIONES DEL BERBERECHO
CERASTODERMA EDULE EN GALICIA**

Fdo. : Seila María Díaz Costas

Instituto de Acuicultura

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015





XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL
E DO MAR

Dra. D.^ª M.^ª Jesús Carballal y Dr. D. Antonio Villalba García,
como Directores de la tesis titulada:

«Neoplasia diseminada en poblaciones del berberecho *Cerastoderma edule* en Galicia»

Por la presente DECLARAMOS:

Que la tesis presentada por D.^ª Seila M.^ª Díaz Costas es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del Reglamento de Estudios de Doctorado, por la modalidad de compendio de artículos, en los que el doctorado tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo. Los coautores, tanto doctores como no doctores, de dichos artículos conocen la inclusión de estos artículos en esta tesis doctoral y ninguno de los artículos reunidos en esta tesis será presentado por ninguno de ellos en otra tesis doctoral, lo que firmamos bajo nuestra responsabilidad.

Vilanova de Arousa, a 28 de setembro de 2015.

Fdo.: Dra. D.^ª M.^ª Jesús Carballal

Fdo.: Dr. D. Antonio Villalba García





Prof. Dr. D. Paulino Martínez Portela,
como Tutor de la tesis titulada:

«Neoplasia diseminada en poblaciones del berberecho *Cerastoderma edule* en Galicia»

Por la presente DECLARO:

Que la tesis presentada por D.^a Seila M.^a Díaz Costas es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del Reglamento de Estudios de Doctorado, por la modalidad de compendio de artículos, en los que el doctorado tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo. Los coautores, tanto doctores como no doctores, de dichos artículos conocen la inclusión de estos artículos en esta tesis doctoral y ninguno de los artículos reunidos en esta tesis será presentado por ninguno de ellos en otra tesis doctoral, lo que firmo bajo mi responsabilidad.

Lugo, a 28 de septiembre de 2015.

Fdo.: Prof. Dr. D. Paulino Martínez Portela



AGRADECIMIENTOS

Debo dar gracias infinitas a Susi y Antonio, verdaderos maestros sin los cuales esta memoria no hubiera sido posible. Especialmente me gustaría agradecerles el tiempo dedicado a formarme. Gracias por ser tan accesibles y siempre resolver mis millones de dudas. Gracias por enseñarme las técnicas histopatológicas. Gracias por las facilidades que se me han dado para formarme en diversas técnicas acudiendo a otros laboratorios. Gracias por disfrutar con vuestro trabajo y transmitírnoslo. Gracias por la paciencia y ánimos dados para que este trabajo se concluyera.

También agradecer al Dr. Paulino Martínez por acceder a ser mi tutor y facilitarme todos los trámites burocráticos.

A mis compañeras de los “buenos tiempos”: Pili, Sandra y Asun. Pese a nuestras formas tan diferentes de ver las cosas, como todas llegaban a encajar propiciando ese buen clima tan necesario para trabajar. Gracias por compartir vuestros conocimientos y consejos a esta pupila. Por esos cafés anuales, que ya hecho de menos, bien sobre los suelos mojados de Santiago de Compostela o las tardes de terrazas frente a los parques de cultivo de Carril.

A Asun muchas gracias por el tiempo dedicado a enseñarme diferentes técnicas. Aunque muchas veces el tiempo y esfuerzo empleado no dieran lugar a resultados científicos fructíferos, quizá me guardo el mejor resultado, la experiencia de trabajar contigo.

A Maribel y Elena, por conservar en el CIMA ese rinconcito dónde se puede hablar de todo, dónde el agobio no entra si no es llamado, dónde todo se puede y dónde el trabajo no falta. Por todas las perfectas preparaciones histológicas que preparan con cariño y rapidez. Y por todas las preguntas por el estado de mi maleta... Ahora os respondo: no os preocupéis, los últimos meses ha pasado por el Hospital Meixoeiro, le han puesto una tirita y ya está recuperada.

A todas las personas que en este tiempo han pasado por ese rinconcito: Fátima, Bea, María Obdulia, Lupe, Raquel... y sobre todo a Sonia y María. A Sonia, por su sonrisa interminable y siempre dispuesta a ayudar. Y a mi Maricuchi... por todo. Por empezar juntas, por hacerme de chófer y de osado copiloto con mi recién sacado carnet. Por las carreras con sillas por los pasillos, cuando la rodilla no me permitía caminar. Porque hasta las tres nunca existía... tanto fuera de madrugada como al medio día. Por las grandes partidas al bingo con nuestros berberechos enumerados que siempre llagaban a las tres cifras.

A Carmen y Ana por hacer aún más entretenido las horas incontables observando cortes histológicos y por brindarme vuestra ayuda siempre que la he necesitado.

A David por los consejos de un viejo veterano, y gracias por ayudarme a darle este último empujón.

A mis antiguos compañeros de coche que entre las conversaciones más variopintas nos recorríamos anualmente una distancia mayor a la que nos llevaría directos a Australia: Molaes, Gemma, Zapa (estés dónde estés), Elvira y Andrea.

A Pili (pese a atreverse a ponerme el primer apodo de mi vida y que fuera “Berberecha”) y Esther; por sorprenderme al encontrar esos artículos escritos a máquina de escribir e introducirme a las grandes bases de datos electrónicas bibliográficas.

A José Manuel por esas horas tan intempestivas en las que en todo este tiempo, y no muy lejano, te he molestado y tú siempre dispuesto a brindar tú ayuda.

A todos los compañeros con los que compartía esa media hora diaria al lado de esa máquina de café que con el tiempo los cafés dejaban de ser malos: Fátima, María José, Gema, José, Rafa, Carmen Vigo...

Y en general a todos los compañeros del “Centro de Investigaciones Mariñas”, presentes y pasados.

Al personal del C.A.C.T.I. (Centro de Apoyo Científico-Tecnológico a la Investigación) de la Universidad de Vigo: A Suso Méndez e Inés Pazos por su asistencia técnica en el desarrollo de la microscopía electrónica y confocal; A Basti por su ayuda con el citómetro de flujo; Jorge Millos por el análisis de metales pesados en tejidos de berberechos.

A Phillippe Soudant y al resto del personal del “Laboratoire des Sciences de l’Environnement Marin” del “Institut Universitaire Européen de la Mer”. Gracias por iniciarme en el mundo de la citometría. Pero sobretodo millones de gracias por acogerme tan bien en mi primera estancia en el extranjero. De ella aprendí algo muy importante, que haciendo un pequeño esfuerzo se puede hacer sentir muy bien a una persona que se encuentra lejos de su casa. Vivencia que desde ese mismo momento he intentado aplicar y me ha dado muchas alegrías.

Al personal del “Laboratoire de Génétique et Pathologie” del IFREMER de La Tremblade: Especialmente a Tristan Renoult, Benja Morga y Isabelle Arzul, que me hicieron sentir como en mi laboratorio.

Al personal del departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de la Coruña. Especialmente a Josefina Méndez por acogerme en el laboratorio y a Ana Ínsua por ayudarme con las técnicas citogenéticas y a las charlas mientras comíamos, cuánta razón tenías... Y al personal del departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela especialmente a Jesús Romalde.

Al personal del departamento de IPIMAR, especialmente a Alexandra Leitao, ha sido un placer colaborar con tu equipo, cualquier colaboración futura será bien recibida.

A mis amigos: Loli, Vero, Rakel, Bernar y Marina; Al UCA-Clan; Laurita, Tania, Pepa, Irene y Laura por siempre preguntar para ¿cuándo va? A Isabel, por nuestros comienzos en este especial mundo juntas, por ese hombro en el que apoyarse cuando las piernas flaquean. A todos ellos, por eso y millones de cosas más.

A Esther y Miri, qué con este tomo por fin puedo explicar mis horas extra de trabajo. A ellas y al gran Ian, que siempre estuvieron, siempre están y sé, que siempre estarán.

Y siempre por mil razones, a J. Brooks.

RESUMEN

Título: Neoplasia diseminada en poboacións do berberecho *Cerastoderma edule* en Galicia.

Resumo: O berberecho *Cerastoderma edule* é unha especie de gran interese comercial en Galicia. É unha das especies de bivalvo con máis capturas anuais e polo tanto ten unha elevada importancia económica e ecolóxica nesta rexión. Estudos patolóxicos realizados asociados a episodios de mortalidade de berberechos en Galicia, detectaron prevalencias elevadas da alteración patolóxica neoplasia diseminada. Os coñecementos sobre o cancro en moluscos son escasos. Este estudo pretende afondar nos coñecementos sobre a epidemioloxía desta enfermidade, a súa etioloxía e os cambios bioquímicos e fisiolóxicos que ocasiona. Só cun coñecemento profundo desta enfermidade poderanse deseñar estratexias de loita contra a mesma.

Palabras chave: Berberecho, neoplasia diseminada, epidemioloxía, etioloxía, células da hemolinfa, p53.

Título: Neoplasia diseminada en poblaciones del berberecho *Cerastoderma edule* en Galicia.

Resumen: El berberecho *Cerastoderma edule* es una especie de gran interés comercial en Galicia. Es una de las especies de bivalvo con más capturas anuales y por lo tanto tiene una elevada importancia económica y ecológica en esta región. Estudios patológicos realizados asociados a episodios de mortalidad de berberechos en Galicia, detectaron prevalencias elevadas de la alteración patológica neoplasia diseminada. Los conocimientos sobre cáncer en moluscos son escasos. Este estudio pretende ahondar en los conocimientos sobre la epidemiología de esta enfermedad, su etiología y los cambios bioquímicos y fisiológicos que ocasiona. Sólo con un conocimiento profundo de esta enfermedad se podrán diseñar estrategias de lucha contra la misma.

Palabras clave: berberecho, neoplasia diseminada, epidemiología, etiología, células de la hemolinfa, p53

Title: Disseminated neoplasia in cockle *Cerastoderma edule* populations in Galicia

Summary: Cockle *Cerastoderma edule* is a species of great commercial interest in Galicia. It is one of the bivalve species with more annual catches and, therefore, has a high economic and ecological importance in this region. Pathological studies associated with cockle mortality events in Galicia detected high prevalence of a pathological condition known as disseminated neoplasia. Knowledge of cancer in molluscs is scarce. This study aims to deep in the knowledge about the epidemiology of this disease, its etiology and the biochemical and physiological changes it causes. A thorough knowledge of this disease is required to develop strategies to fight it.

Key words: cockle, disseminated neoplasia, epidemiology, etiology, haemolymph cells, p53.



LISTA DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

- **Díaz, S.**, Iglesias, D., Villalba, A., Carballal, M.J. (En revisión). Long term epidemiological study of disseminated neoplasia of cockles in Galicia (NW Spain): temporal patterns at individual and population levels, influence of environmental and cockle-based factors, and lethality. *Journal of Fish Diseases*.
- Matias, A. M., **Díaz, S.**, Teixeira de Sousa, J., Villalba, A., Carballal, M. J., Leitão, A., 2014. Karyotype variation in neoplastic cells associated to severity of disseminated neoplasia in the cockle *Cerastoderma edule*. *Aquaculture*, 248-249, 233-225.
- Carballal, M.J., Iglesias, D., **Díaz, S.**, Villalba, A., 2013. Disseminated neoplasia in clams *Venerupis aurea* from Galicia (NW Spain): Histopathology, ultrastructure and ploidy of the neoplastic cells, and comparison of diagnostic procedures. *Journal of Invertebrate Pathology*. 112, 16-19.
- **Díaz, S.**, Villalba, A., Insua, A., Soudant, P., Fernandez, J., Méndez, J., Carballal, M.J., 2013. Disseminated neoplasia causes changes in ploidy and apoptosis frequency in cockles *Cerastoderma edule*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 113, 214–219.
- Ruiz, P., **Díaz, S.**, Orbea, A., Carballal, M.J., Villalba, A., Cajaraville, M.P., 2013. Biomarkers and transcription levels of cancer-related genes in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain) with disseminated neoplasia. *Aquatic Toxicology*, 136-137, 101-111.
- Manso, C.F., **Díaz, S.**, Carballal, M.J., Villalba, A., Romalde, J.L., 2012. Detection of reverse transcriptase activity in golden carpet shell clams (*Venerupis aurea*) with disseminated neoplasia. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 32(2), 56-63.
- **Díaz, S.**, Renault, T., Villalba, A., Carballal, M.J., 2011. *Disseminated neoplasia in cockles Cerastoderma edule*: ultrastructural characterisation and effects on haemolymph cell parameters. *Diseases of Aquatic Organisms*. 96(2), 157-167.
- **Díaz, S.**, Cao, A., Villalba, A., Carballal, M.J., 2010. Expresión of mutant protein p53 and hsp70 and hsp90 chaperones in cockles *Cerastoderma edule* affected by neoplasia. *Diseases of Aquatic Organisms* 90, 219-226.
- Romalde, J.L., Vilaño, M.L., Beaz, R., Rodríguez, J.M., **Díaz S.**, Villalba, A. Carballal M.J., 2007. Evidence of retroviral etiology for disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 94, 95-101.
- Carballal, M.J., **Díaz, S.**, Villalba, A., 2005. *Urosporidium* sp. hyperparasite of the turbellarian *Paravortex cardii* in the cockle *Cerastoderma edule*. *Journal of Invertebrate Pathology* 90(2), 104-110.

CAPÍTULOS EN LIBROS

- **Díaz, S.**, Carballal, M.J., Villalba, A. 2007. Diferencias de parásitos y alteraciones patológicas entre berberechos enterrados y desenterrados. En: IX Foro de los Recursos Marinos y de la Acuicultura de las Rías Gallegas. M. Rey Méndez, J. Fernández Casal, M. Izquierdo Rodríguez, A. Guerra Díaz (Ed.), Santiago de Compostela, pp. 237-238. ISBN: 978-84-60-0590-8.
- **Díaz, S.**, Carballal, M.J., Villalba, A. 2007. Transmisión de neoplasia diseminada entre berberechos, *Cerastoderma edule*. En: XI Congreso Nacional de Acuicultura. A. Cerviño Eiroa, A. Guerra Díaz, C. Pérez Acosta (Ed.), Vigo, pp. 1013-1016. ISBN: 978-84-611-9085-0.
- Carballal, M.J., Iglesias, D., **Díaz, S.** 2011. Enfermedades neoplásicas en moluscos de interés comercial. En: Enfermedades de Moluscos Bivalvos de interés en acuicultura. A. Figueras, B. Novoa (Ed.), Madrid, pp. 33-70. ISBN: 978-84-00-09288-7.
- **Díaz, S.**, Mandinabeitia, I., Villalba, A., Ho, J., Carballal, M. J. 2011. Presencia y efectos patológicos del copépodo (*Herrmannella rostrata* Canu, 1891) en berberechos (*Cerastoderma edule* Linnaeus, 1758) de Galicia (NO España). En: IV Foro Iberoamericano de Recursos Marinos en Acuicultura, Asociación Cultural Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas (Ed.), Santiago de Compostela, pp. 435-444. ISBN: 978-84695-6332-8.



ABREVIATURAS

A

AAD: amino-actinomicina D
 AAS-CV: espectrometría de absorción atómica con vapor frío
 AAS-F: espectrometría de absorción atómica con llama
 ADN: ácido desoxirribonucleico
 ARN: ácido ribonucleico
 ASW: Agua de mar artificial
 AU: unidades arbitrarias

B

Bp: pares de bases
 BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina-5'
 BrdUTP: 5-bromo-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato

C

Ca⁺²: ion calcio
 CaCl₂: Cloruro cálcico
 Cd: cadmio
 Cdc: ciclo de división celular
 cDNA: ácido desoxirribonucleico codificante
 Cr: cromo
 Cu: Cobre
 °C: grados centígrados

D

DCF: diclorofluoresceína
 DCFH-DA: diclorofluoresceína diacetato
 DF: grados de libertad
 DMSO: dimetilsulfóxido
 DN: neoplasia diseminada
 DNA: ácido desoxirribonucleico
 Dnase: desoxirribonucleasa
 dNTP: desoxirribonucleótidos 5'-trifosfato

E

e.g.: por ejemplo
 EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
 et al.: y colaboradores
 ETAAS: espectrometría de absorción atómica electrotrémica

F

FDA: fluoresceína diacetato
 Fig.: figura
 FS: dispersión frontal
 FSC: canal de dispersión frontal

G

g: gramo
 Gadd: Detención del crecimiento y daño del ADN
 Ge: germanio
 Gf: folículo gonadal
 Gl: índice gonadal
 GTP: guanosina tri-fosfato

H

h: hora
 HAV: virus de la hepatitis A
 Hc: hemocitos
 HEPES: ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-piperazin-etanosulfónico
 Hg: mercurio
 HNO₃: ácido nítrico
 HSP: proteínas de choque térmico
 H₂O₂: peróxido de hidrógeno
 H₂O: agua

I

ICP-MS: espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo.
 In: indio
 IκB: inhibidor kappa beta

K

KCl: cloruro potásico
 kDa: kilodalton
 kV: kilovoltio

L

l: litro
 LM: microscopio óptico
 LOG: Logaritmo
 Lsm3: proteína tipo-sm asociada al complejo U6 de corte y empalme del ARNm

M

μl: microlitros
 μm: micrómetro
 μM: micromolar
 μmol: micromol
 m²: metro cuadrado
 mg: miligramo
 MgCl₂: cloruro de magnesio
 MgSO₄: sulfato de magnesio
 Min: minuto

ml: mililitros
mM: milimolar
MMIF: factor inhibidor de la migración del macrófago
M-MLV: virus de la leucemia murina de Moloney
Mn: manganeso
mQ: miliQ
mut: mutado

N

N: tamaño de muestra
N: norte
N0: no afectados
N1: intensidad baja de neoplasia diseminada
N2: intensidad media de neoplasia diseminada
N3: intensidad alta de neoplasia diseminada
N4: intensidad muy alta de neoplasia diseminada
NaCl: cloruro sódico
NaF: fluoruro sódico
Nc: células neoplásicas
Ni: níquel
NW: Noroeste

P

PAH: hidrocarburo aromático policíclico
Pb: plomo
PBS: Tampón fosfato salino
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
pg: picogramos
PI: yoduro de propidio
pNPP: p-nitrofenil fosfato
PPA2: fosfoproteína fosfatasa 2

R

R²: coeficiente de correlación
Rab: proteína de unión a GTP relacionada con la familia ontogénica ras
Rbx: "ring box"

Rcc: regulador de la condensación del cromosoma
RNA: ácido ribonucleico
Rnase: ribonucleasa
ROI: Intermediario reactivo de oxígeno
rpm: revoluciones por minuto
RT: transcriptasa inversa

S

s: segundos
SD: desviación estándar
SMC: mantenimiento estructural de cromosomas
SS: dispersión lateral
SSC: canal de dispersión lateral

T

T: tonelada
Tdt: Deoxinucleotidil transferasa terminal
TEM: Microscopio electrónico de transmisión
THAP: proteína asociada a la apoptosis
Tl: talio
Trib: homólogo de tribbles
Tris-HCl: hidrocloreto de hidroximetil aminometano

U

U: unidad
UV: ultravioleta

V

V: voltios

W

W: oeste
wt/vol: relación peso total/volumen

Z

Zn: zinc

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	17
1.1 Biología del berberecho y factores socio-económicos de esta especie en Galicia	19
1.2 Parásitos y alteraciones patológicas en el berberecho	22
BACTERIAS	22
HONGOS	23
PROTOZOOS	23
METAZOOS	25
VIRUS	27
NEOPLASIA.....	28
1.3 Neoplasia en moluscos bivalvos.....	29
1.4 Neoplasia gonadal	30
1.5 Neoplasia diseminada	32
MORFOLOGÍA	32
DISTRIBUCIÓN	32
ONTOGENIA.....	37
DIAGNOSIS.....	38
CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LAS CÉLULAS CIRCULANTES.....	40
EPIDEMIOLOGÍA	41
ETIOLOGÍA	44
BASES MOLECULARES	47
2. OBJETIVOS.....	51
3. ALTERACIONES DE LA PLOIDÍA, CARIOTIPO Y FRECUENCIA DE APOPTOSIS	55
3.1 La neoplasia diseminada provoca cambios en la ploidia y la frecuencia de apoptosis en berberechos <i>Cerastoderma edule</i>	57
3.2 Variación del cariotipo en células neoplásicas asociada a la intensidad de neoplasia diseminada en berberechos <i>Cerastoderma edule</i>	59
4. ALTERACIONES PROTÉÍNICAS.....	61
4.1 Expresión de la proteína p53 mutada y las proteínas chaperonas Hsp 70 y Hsp 90 en berberechos <i>Cerastoderma edule</i> afectados por neoplasia	63

5. CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS Y ALTERACIÓN DE PARÁMETROS INMUNITARIOS	65
5.1 Neoplasia diseminada en berberechos <i>Cerastoderma edule</i> : Caracterización ultraestructural y efectos en parámetros de las células de la hemolinfa.....	67
6. TRANSMISIBILIDAD Y ETIOLOGÍA	69
6.1 Evaluación de la transmisibilidad de la neoplasia diseminada que afecta a los berberechos de Galicia y de su asociación con contaminación por metales pesados.	71
6.2 Evidencia de etiología retroviral de la neoplasia diseminada de berberechos <i>Cerastoderma edule</i>	81
7. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS: DINÁMICA TEMPORAL, INFLUENCIA DE FACTORES ENDÓGENOS Y EXÓGENOS Y LETALIDAD DE LA ENFERMEDAD	89
7.1 Estudio epidemiológico prolongado de la neoplasia diseminada de berberechos <i>Cerastoderma edule</i> (L.) en Galicia (NW España): evaluación de patrones temporales a nivel individual y poblacional, influencia de factores ambientales y de factores propios de los berberechos y letalidad.....	91
8. DISCUSIÓN GENERAL	93
9. CONCLUSIONES.....	101
10. BIBLIOGRAFÍA.....	105





1. INTRODUCCIÓN GENERAL



1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Biología del berberecho y factores socio-económicos de esta especie en Galicia

El berberecho, *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) es un molusco bivalvo perteneciente al orden Veneroida y familia Cardiidae. Su distribución abarca desde la costa norteafricana (Senegal) hasta las costas del norte de Europa (Noruega), incluyendo la costa mediterránea. Es una especie que puede habitar en estuarios y bahías arenosas, de fango o de grava fina.

Los berberechos viven entre dos y cuatro años de media, pero pueden alcanzar excepcionalmente hasta los diez años. El fenómeno de reproducción está altamente influenciado por la temperatura. Es una especie dioica aunque se detectan individuos hermafroditas con frecuencia baja (Guillou et al., 1990). El berberecho es un bivalvo preferentemente intermareal, que se asienta en los primeros centímetros del sedimento debido al pequeño tamaño de sus sifones (Ansell et al., 1981), exponiéndose a las condiciones atmosféricas durante la marea baja. Este hecho facilita su captura, que en Galicia se sigue realizando de forma tradicional. La extracción del berberecho en Galicia se realiza a pie en los bancos intermareales (Fig. 1) y las artes más utilizadas son el “sacho” y el “angazo”, o bien a flote en los bancos sumergidos utilizándose el “raño” y el “rastros”. El marisqueo en los bancos de berberecho en Galicia es una actividad básicamente extractiva.



Fig 1: Mariscadoras capturando moluscos bivalvos en la bajamar en las rías bajas gallegas.

El marisqueo es una actividad socio-económica de primer orden en Galicia, pues ocupa unas 8500 personas (Molares et al., 2008). La mayoría de las especies extraídas son moluscos bivalvos, aunque también se incluyen dentro de esta actividad moluscos gasterópodos, equinodermos y crustáceos. El número de especies marisqueras con interés comercial en Galicia es elevado, unas 26 especies diferentes; sin embargo, el berberecho es una de las especies que destaca por su importancia económica (Molares et al., 2008). En la tabla de ventas en lonjas gallegas del año 2014 (Tabla 1), se puede apreciar que el berberecho ocupa el segundo lugar en cantidad y el cuarto en ingresos de los bivalvos explotados en Galicia exceptuando el mejillón. Previamente a la mortandad masiva ocasionada por la marteiliosis (Villalba et al., 2014), el berberecho ocupaba el primer lugar por toneladas de captura en la lista de ventas de las lonjas.

Tabla 1: Importancia relativa de los bivalvos explotados en Galicia en 2014. Fuente: Xunta de Galicia. Plataforma Tecnológica da Pesca.

Especie	Nombre científico	Kilos	% Kilos	Importe	% Importe
Almeja babosa	<i>Venerupis corrugata</i>	894920	17,13	11041097	24,93
Almeja bicuda	<i>Polititapes aureus</i>	4936	0,09	18295	0,04
Almeja fina	<i>Ruditapes decussatus</i>	548890	10,51	10554900	23,83
Almeja rubia	<i>Polititapes rhomboides</i>	377265	7,22	2608513	5,89
Almeja japonesa	<i>Ruditapes philippinarum</i>	1364584	26,12	8520324	19,24
Ameixón	<i>Callista chione</i>	30997	0,59	31068	0,07
Berberecho	<i>Cerastoderma edule</i>	1185988	22,70	7354780	16,61
Birollo	<i>Cerastoderma glaucum</i>	10186	0,20	25175	0,06
Cadelucha	<i>Donax trunculus</i>	6884	0,13	177735	0,40
Carnero	<i>Venus verrucosa</i>	63366	1,21	250609	0,57
Cornicha	<i>Spisula solida</i>	1250	0,02	4557	0,01
Longueirón	<i>Ensis siliqua</i>	21974	0,42	138682	0,31
Longueirón vello	<i>Solen marginatus</i>	31100	0,60	102534	0,23
Navaja	<i>Ensis arcuatus</i>	407187	7,80	2703296	6,10
Ostra plana	<i>Ostrea edulis</i>	35560	0,68	172038	0,39
Ostra rizada	<i>Crassostrea gigas</i>	19945	0,38	20073	0,05
Rabioso	<i>Glycymeris glycymeris</i>	1869	0,04	1468	0,00
Vieira	<i>Pecten maximus</i>	91346	1,75	277715	0,63
Volandeira	<i>Aequipecten opercularis</i>	120801	2,31	262899	0,59
Zamburiña	<i>Chlamys varia</i>	4575	0,09	26549	0,06
TOTAL		5223626		44292306	

Atendiendo a la evolución de las ventas de berberecho en Galicia (Fig. 2), éste alcanzó niveles muy elevados con un promedio de 11850 t/año en el periodo de 1961-1972, seguido por un descenso brusco en 1978 hasta valores mínimos en 1985. La población de berberecho se recuperó paulatinamente hasta que en 2001 volvió a caer la producción. Se han asociado los descensos bruscos de la población con descensos bruscos de la salinidad (Parada et al., 2007). En las ventas totales de este recurso realizadas en Galicia, más de la mitad (60.39%) solían corresponder a las lonjas situadas en el interior de las rías de Noia y Arousa. Estas lonjas además eran responsables del 98.6% de la variación interanual de las ventas gallegas de berberecho. La explicación de que en estos bancos las poblaciones de berberecho muestren grandes variaciones de la producción anual, es que están localizados en la desembocadura de ríos muy caudalosos, de forma que las caídas bruscas de salinidad tras lluvias intensas dan lugar a mortalidad elevada de berberecho (Molares et al., 2008). La situación descrita cambió tras el colapso de la pesquería de berberecho en la ría de Arousa debido a la infección por *Marteilia cochillia* (Villalba et al., 2014).

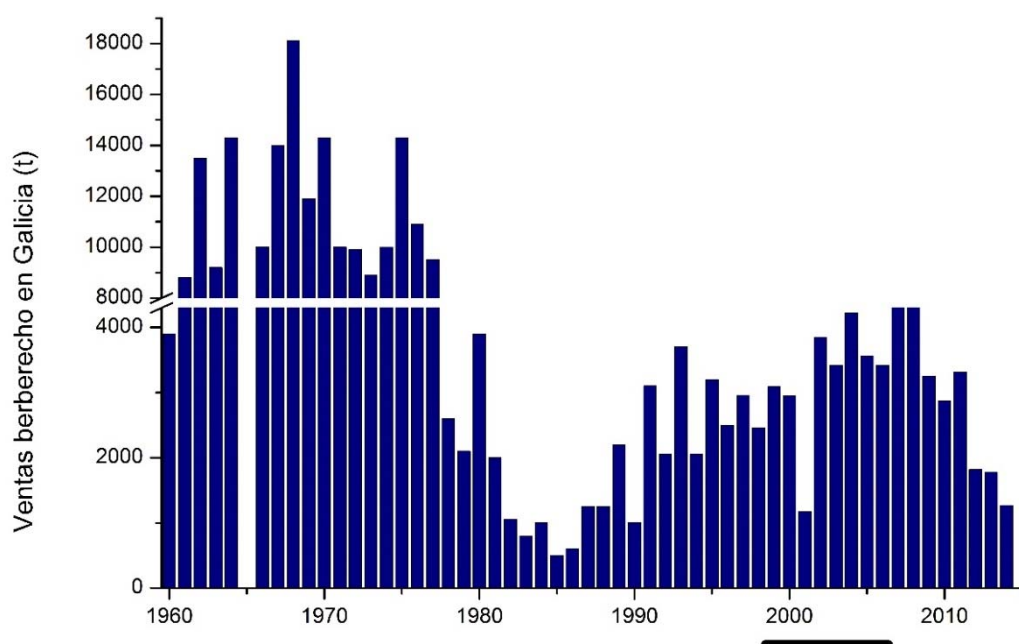


Figura 2: Evolución de ventas de berberecho de Galicia según estadísticas oficiales. Fuente: 1960-1986: Dirección General de Pesca Marítima; 1987-2014: Xunta de Galicia. Plataforma Tecnológica da Pesca. Los años marcados con una línea horizontal corresponden a los años en que se han realizado los muestreos para este estudio.

1.2 Parásitos y alteraciones patológicas en el berberecho

Los estudios de alteraciones patológicas que se han realizado en berberechos surgen para buscar explicaciones a mortalidades masivas o densidades de población anormales. El berberecho es una especie con alta tasa de reclutamiento y un crecimiento rápido, por lo que el daño económico que causan las mortalidades anormales no es tan elevado como en otras especies. A continuación se realiza una revisión sistemática de los parásitos y comensales asociados a esta especie. Se ha realizado una actualización de la revisión de Longshaw y Malhan (2012) con respecto a especies que afectan a berberechos y clasificación sistemática de estas según de acuerdo con información sobre características moleculares.

BACTERIAS

En berberechos de Galicia se detectaron organismos basófilos bacterianos en branquia y túbulos digestivos no asociados con respuesta defensiva y sin causar problemas patológicos importantes aunque, con intensidades altas, la estructura de tejidos y órganos se podía ver afectada. Se distinguieron tres tipos: colonias redondeadas e intracelulares constituidas por organismos de tipo rickettsiano, colonias intracelulares de tipo clamidiano y quistes extracelulares relativamente grandes que encerraban en su interior organismos de naturaleza bacteriana (Carballal et al., 2001). En otros lugares, organismos bacterianos se han asociado con mortalidades de este bivalvo. En Portugal se detectaron organismos de tipo *Mycoplasma* en branquias que, asociados con temperatura alta, se relacionaron con mortalidad (Azevedo, 1993). También se han asociado mortalidades de berberecho con bacterias anaeróbicas (de Zwaan et al., 2002). Babarro y de Zwaan (2001, 2008) demostraron que la administración de antibióticos efectivos contra bacterias gram positivas aumentaba la supervivencia de berberechos en condiciones anóxicas. La bacteria *Pseudomonas flourens* se asoció con el desenterramiento de berberechos (Blanchet et al., 2003) pudiendo causar mortalidad indirecta.

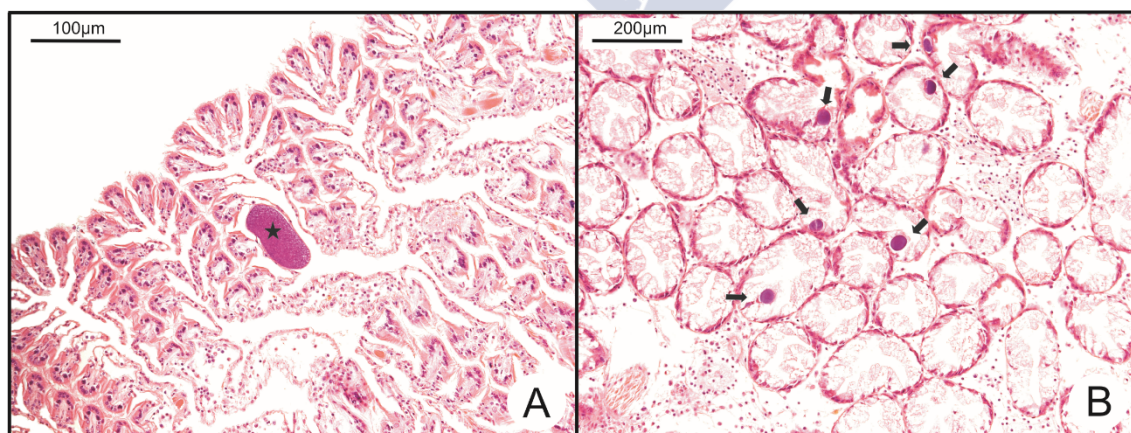


Figura 3: Cortes histológicos de berberechos *Cerastoderma edule* afectados por organismos de tipo bacteriano. A) Quiste bacteriano (*) en branquia. B) Colonias intracelulares (flechas) de tipo rickettsiano en glándula digestiva.

HONGOS

Las infecciones causadas por hongos afectan al berberecho con prevalencias bajas y no causan alteraciones patológicas importantes. Dentro del grupo Microspora, se detectaron en células de la glándula digestiva de berberechos un microsporidio no identificado (Comps et al., 1975) y esporas de un microsporidio del tipo de *Steinhausia* en ovocitos de berberechos (Carballal et al., 2001 y Comtet et al., 2003) con bajas prevalencias y baja intensidad de infección. También se ha detectado al microsporidio *Unikaryon legeri* como hiperparásito de la cercaria *Gymnophallus minutus* en berberechos aunque no causaba daño al molusco (Azevedo y Canning 1987, Goater 1993).

PROTOZOOS

Entre los protozoos parásitos del grupo Alveolata, se han detectado tanto miembros del grupo Apicomplexa como del género *Perkinsus* y del grupo Ciliophora.

Grupo Apicomplexa: Se observaron prevalencias altas de la gregarina *Nematopsis* sp. (Azevedo y Cachola 1992, Carballal et al., 2001) y otras gregarinas no identificadas (Carballal et al., 2001). También se detectaron varias especies de coccidios, como oocistos de *Cryptosporidium parvum* (Gómez-Bautista et al., 2000), distintas fases del ciclo vital de un coccidio del género *Pseudokloossia* sp. (Carballal et al., 2001) y de otro coccidio no identificado en la hemolinfa del berberecho (Díaz, datos no publicados). En general la presencia de estos apicomplexa no se asoció con daños importantes en el hospedador, excepto *Nematopsis* sp., que en berberechos de Portugal se asoció con mortalidad, sin aportar una demostración sólida (Azevedo y Cachola, 1992).

Género Perkinsus: La primera detección de *Perkinsus* sp en berberechos fue en Italia (Da Ros y Canzonier, 1985) y recientemente se ha descrito en Francia (Lasalle et al., 2007). España se ha detectado *Perkinsus olseni* (Darriba et al., 2010) con prevalencias e intensidades muy bajas y no asociados con mortalidad. Carrasco et al. (2014) han detectado *Perkinsus chesapeaki* por primera vez en berberechos de la costa mediterránea española.

Grupo Ciliophora: se han descrito en berberechos *Hypocomella raabei =cardii* (Fenchel 1965, Chatton y Lwoff 1922), *Sphenophyra cardii* (Chatton y Lwoff, 1950), *Trichodina* sp. (Lauckner, 1983; Carballal et al., 2001) y *Rynchodida* sp. (Carballal et al., 2001). Estos ciliados se detectaron en branquias y cavidad paleal, sin provocar alteraciones importantes en el berberecho.

Grupo Haplosporidia se describieron esporas de *Haplosporidium ascidiarium* (Lauckner, 1983) y se descubrió una nueva especie, *Haplosporidium edule* (Azevedo et al. 2003), predominante en la glándula digestiva y sus tejidos circundantes; se registraron prevalencias bajas de estos haplosporidios por lo que no causaban daño importante a las poblaciones de berberecho, aunque los individuos afectados por *H. edule*

sufrían lesiones graves (Azevedo et al., 2003). *Urosporidium* sp. se detectó como hiperparásito de un turbelario localizado en el lumen digestivo del berberecho *C. edule* (Carballal et al., 2005), sin asociación con efecto nocivo para el molusco.

Grupo Paramyxida se describió en Francia *Marteilia* sp. en glándula digestiva (Comps et al., 1975; Auffret y Poder, 1986) con prevalencia baja. En la región del Delta del Ebro y asociado con un evento de mortalidad se detectó *Marteilia* sp. con prevalencias alrededor del 40% (Carrasco et al., 2011). Pruebas moleculares evidenciaron que la *Marteilia* que afectaba a los berberechos del litoral catalán era una especie diferente de *Marteilia refringens*, que afecta a mejillones y ostras (Carrasco et al., 2012), lo que dio lugar a la descripción de una nueva especie, *Marteilia cochillia* (Carrasco et al., 2013). En Galicia se detectó *Marteilia cochillia* en la ría de Arousa, en febrero 2012, que en pocos meses causó una mortalidad masiva, colapsando la pesquería del berberecho en esta ría (Villalba et al., 2014).

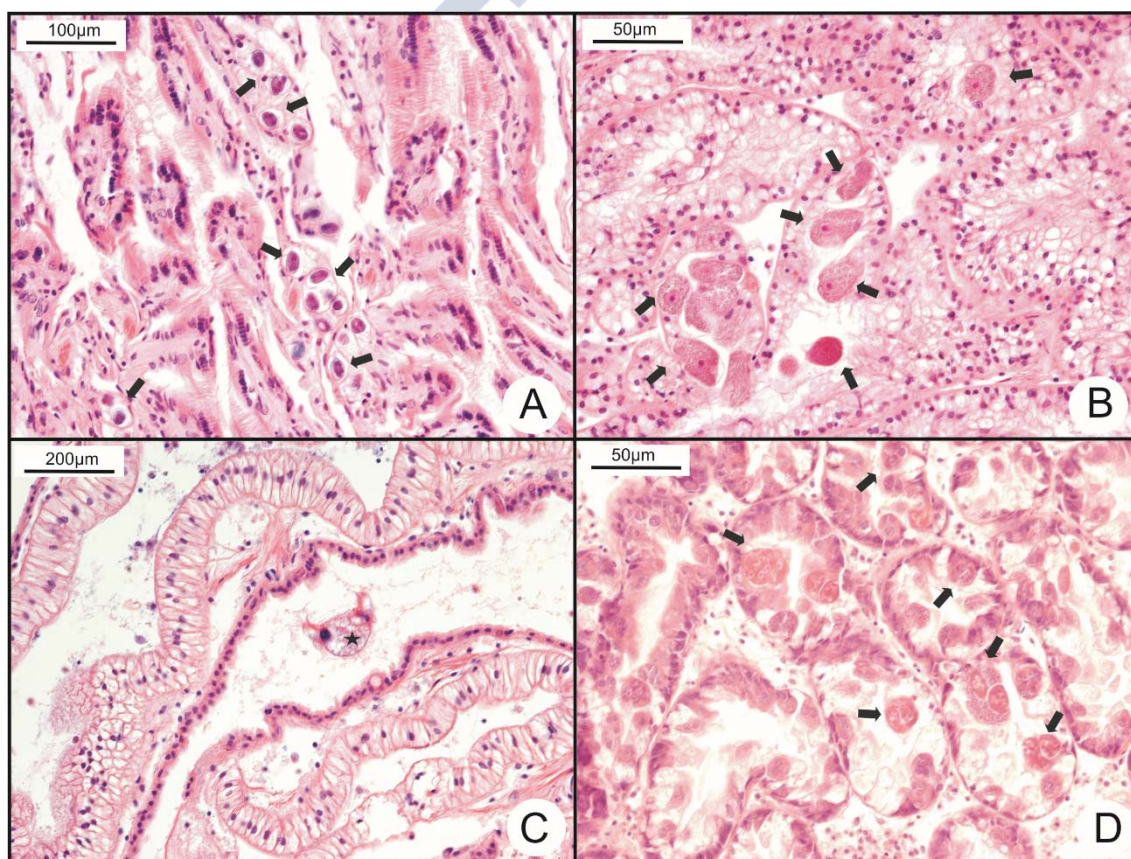


Figura 4: Cortes histológicos de berberechos *Cerastoderma edule* afectados por parásitos protistas. A) Ooquistes de *Nematopsis* sp. (flechas) en branquia. B) Microgamontes (flecha) de *Pseudoklossia* sp. en riñón. C) Ciliado *Trichodina* sp. (estrella) en la cavidad paleal, cerca del manto. D) *Martelia cochillia* (flechas) infectando el epitelio de túbulos digestivos.

METAZOOS

En el berberecho se han detectado metazoos parásitos del **phylum Arthropoda** (subclase Copepoda). Se han descrito copépodos *Mytilicola intestinalis* (Hepper 1953) y un copépodo no identificado de tipo *Mytilicola* en el lumen intestinal (Carballal et al., 2001). Además, se han observado copépodos situados en la cavidad paleal, manto y branquias de la especie *Herrmannella rostrata* (Canu 1892, Atkins 1934, Díaz et al., 2011a). En ningún caso se asociaron los copépodos con lesiones graves en berberecho. Además, el cangrejo guisante *Pinnotheres pisum* (Subclase Eumalacostraca) se detectó en la cavidad paleal de *C. edule* en Marruecos, con prevalencias superiores al 70%; los estudios realizados no aluden a efectos patológicos importantes (James et al., 1977; Gam et al., 2008).

Del **phylum Plathelminthes** se han detectado individuos de las clases Turbellaria, Trematoda y Cestoda. Se describieron los turbelarios *Paravortex cardii* (Atkins et al., 1934; Carballal et al., 2001, 2005) y *Paravortex gemellipara* (Brusa et al., 2006) en el lumen digestivo del berberecho, sin causar un daño importante.

Los berberechos son hospedadores de un amplio rango de trematodos digénidos en diferentes estadios del ciclo de vida y diferentes ámbitos geográficos. Se han registrado casos correspondientes a las familias: Bucephalidae, Monorchidae, Gymnophallidae, Psilostomatidae, Rencolidae, Echinostomatidae y Zoogonidae.

Familia Bucephalidae: Los trematodos pertenecientes a la familia Bucephalidae se consideran uno de los grupos con mayor efecto patogénico en moluscos bivalvos. En berberechos *C. edule* se ha detectado la especie *Labratema minima*, que causa castración parcial o total; también se ha asociado como causante del desenterramiento de berberechos (Lauckner, 1983; Iglesias, 2006).

Familia Monorchidae: *Monorchis parvus* se ha detectado en berberechos juveniles. Esta especie provoca daños tisulares y se ha relacionado con la pérdida de la capacidad de enterrarse y como causa de mortalidad (Jonsson y André, 1992).

Familia Gymnophallidae: No existe consenso entre los géneros que componen esta familia. Schoolz (2002) propone que sean cuatro: *Parvatrema*, *Gymnophallus*, *Gymnophalloides* y *Peudogymnophallus*. Este autor incluye al género *Meiogymnophallus* como sinónimo del género *Parvatrema*, lo que no se acepta por una parte de la comunidad científica (Russell-Pinto et al. 2006; Bartoli y Gibson, 2007; Chai et al., 2007; de Montaudouin et al., 2009). Especies de esta familia se han asociado con mortalidades de berberechos y provocan disfunción en el cierre valvar. Se han descrito como parásitos de berberecho *C. edule*: *Meiogymnophallus minutus* (Bowers y James 1967; Lauckner, 1971; Russell-Pinto, 1993), *Meiogymnophallus fossarum* (Bartoli, 1965; Russell-Pinto 1990), *Gymnophallus choledochus* (Russell-Pinto 1993; de Montaudouin et al., 2000), *Gymnophallus gibberosus* y *Gymnophallus rebecqui* (Russell-Pinto 1993).

Familia Psilostomatidae: La especie *Psilostomum brevicolle*, se detecta en la masa visceral del berberecho en la costa atlántica de Europa (de Montaudouin et al., 2009), sin afectar a la capacidad de enterramiento ni estar asociado con mortalidades.

Familia Rencolidae: La especie *Renicola moscovita* se ha descrito en los palpos de berberechos adultos sin causar problemas patológicos importantes (de Montaudouin et al., 2000; Thieltges y Reige 2006).

Familia Echinostomatidae: Dentro del género *Himasthla* se han detectado las especies *Himasthla elongata*, *H. continua*, *H. interrupta* y *H. quissetensis* parasitando berberechos (Lauckner, 1971; Russell-Pinto, 1993; de Montaudouin et al., 2000; Desclaux et al., 2004; Thieltges y Reise, 2006; Iglesias, 2006; Lassalle et al., 2007; Lonhshaw y Malham, 2012). Estos estudios describen que estos trematodos afectan a la capacidad de supervivencia del berberecho y además reducen su capacidad de enterramiento.

Familia Zoogonidae: La especie *Diptherostomun brusinae* (Pina et al., 2009) se detecta en forma de metacercaria en pie, manto y branquia sin causar problemas patológicos importantes.

En poblaciones de berberecho de Galicia se ha detectado hasta 10 especies diferentes de trematodos digénidos: esporoquistes y cercarias de *L. minima*, metacercarias no enquistadas de *M. minutus* y *M. fossarum* y quistes de metacercarias de tres especies diferentes del género *Himasthla*, *P. brevicolle*, *R. moscovita*, *G. choledochus* y *M. parvus* (Iglesias, 2006).

Clase Cestoda: de Montaudouin et al., (2000) detectaron la presencia de un cestodo no identificado en el pie de dos berberechos en Francia y James et al., (1977) detectaron larvas de *Anatinella brachycephala* en la glándula digestiva y pie de berberechos *C. edule* en Gran Bretaña.

Del **phylum Nematoda** se ha detectado un nematodo ectocomensal no identificado en la cavidad paleal y branquias de *C. edule* que no provoca daños mayores a los estructurales en el huésped (Culurgioni et al., 2006; Figus et al., 2006; Thieltges et al., 2006).

El **Phylum Nemertea** está representado por *Malacobdella grossa*, detectado en la cavidad del manto en berberechos de las Islas Shetland, sin causar problemas serios (Jones et al., 1979).

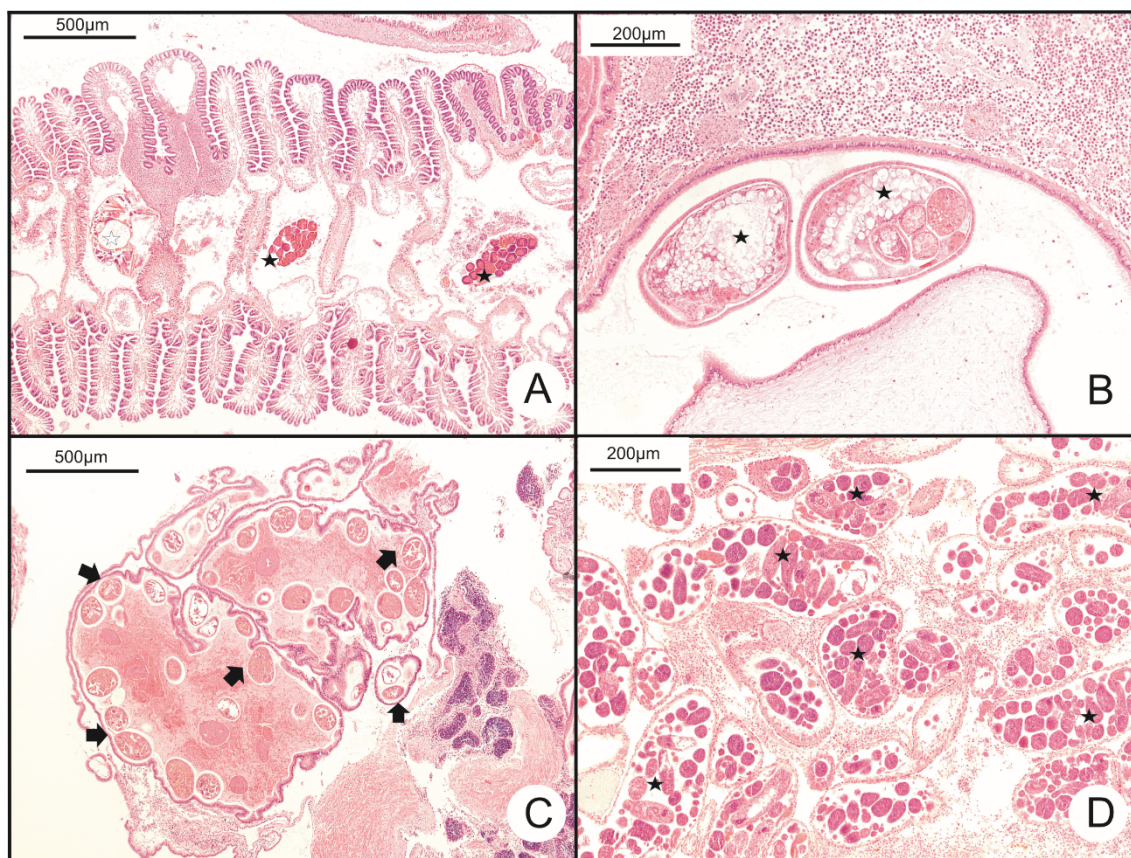


Figura 5: Cortes histológicas de berberechos *Cerastoderma edule* afectados por parásitos metazoos. A) Copépodos de *Hermanella rostrata* (estrellas huecas) y sus sacos ovígeros (estrellas negras) en branquia. B) Turbelario *Paravortex cardii* (*) en el lumen intestinal. C) Metacercarias de *Meioamynophallus minutus* (flechas) envueltas por pliegues del manto. D) Esporoquistes de *Labratrema minimus* (*) en el tejido conjuntivo de la masa visceral.

VIRUS

Villalba et al., (2001) estudiando un episodio de altas mortalidades en las rías gallegas detectaron una alteración patológica anteriormente no descrita denominada **focos grandes de infiltración hemocitaria intensa** (F.G.I.H.I.). Los F.G.I.H.I. consisten en numerosas masas de hemocitos, grandes y muy densas, que afectan a diferentes órganos, ocasionando en casos de intensidad alta, una extensa destrucción de los tejidos, con pérdida de la arquitectura normal de los tejidos y y órganos. Algunos de los hemocitos integrantes de los focos contenían fagocitadas en su interior una o dos células no identificadas. Carballal et al. (2001) detectaron F.G.I.H.I. en seis bancos de berberecho de Galicia. El estudio ultraestructural de esta alteración patológico mostró que había grandes depósitos de material denso a los electrones en algunas células integrantes de los focos. En el interior del citoplasma y dentro de los depósitos densos a los electrones se apreciaron partículas de tipo vírico dispuestas en estructura paracristalina que podrían pertenecer a la familia Picornaviridae. No resultó posible concretar si la respuesta inflamatoria respondía a dichas partículas víricas o estas constituían una infección secundaria del hospedador debido a su posible debilitamiento (Carballal et al., 2003).

Se realizaron estudios epidemiológicos de esta alteración patológica y se detectó una prevalencia media en torno al 50% en los bancos estudiados, a lo largo de un año, asociada con severidad alta. No se observó

estacionalidad en la evolución de los F.G.I.H.I. ni correlación con variables ambientales (Iglesias 2006). Sin embargo se detectó disminución del índice de condición de los berberechos con afectación intensa por F.G.I.H.I. con respecto a los individuos sanos (Iglesias 2006). Todavía no se ha determinado de forma inequívoca la causa de esta alteración patológica y la asociación de F.G.I.H.I. con episodios reiterados de mortalidad alta parece clara (Iglesias, comunicación personal).

Carrasco et al. (2011) se refirieron a una **infección de tipo viral en las células epiteliales** de los túbulos digestivos, aunque la presencia de virus no fue confirmada mediante microscopía electrónica. El daño que esta lesión puede causar en los berberechos no está claramente definido, ya que también estaban afectados por marteliosis.

NEOPLASIA

Se detectó neoplasia diseminada en berberechos de Irlanda (Twomey y Mulcahy, 1984), Francia (Poder y Auffret, 1986) y España (Villalba et al., 2001). En berberechos de Galicia se han descrito dos tipos de células neoplásicas; el más frecuentemente se caracteriza por un gran tamaño celular, núcleo pleomórfico muy grande y una relación núcleo/citoplasma muy elevada. Un segundo tipo que se detectó con prevalencias muy bajas y se caracterizó por presentar un tamaño celular menor, con núcleo de forma redondeada y citoplasma escaso (Carballal et al., 2001). El tipo de neoplasia diseminada más prevalente es el que trataré con más detalle en esta memoria.

Por los efectos patológicos que causan en los berberechos *C. edule*, en particular por las mortalidades que se les atribuye en diferentes estudios, se puede considerar que las enfermedades más importantes que afectan a los berberechos son: neoplasia diseminada, infección por *Marteilia cochillia*, infestación por trematodos y la caracterizada por F.G.I.H.I.

1.3 Neoplasia en moluscos bivalvos

La neoplasia es una alteración del crecimiento celular caracterizada por la proliferación excesiva y anormal de células de manera independiente del patrón definido por los mecanismos reguladores del organismo, que persiste después de finalizado el estímulo que originó el crecimiento y con frecuencia ocasiona la muerte del individuo afectado (Sparks 1985). Las primeras referencias de neoplasia en moluscos bivalvos datan de finales de los años sesenta del siglo pasado y en la actualidad se ha detectado en alrededor de 20 especies en todo el mundo (Carballal et al., en prensa). La neoplasia afecta a importantes especies comerciales, en ocasiones alcanzando niveles epidémicos y desencadenando consecuencias importantes a nivel económico y ecológico (Barber et al., 2004). Se han descrito dos tipos de neoplasia que alcanzan niveles epidémicos en moluscos bivalvos, la neoplasia gonadal y la neoplasia diseminada (Elston et al., 1992; Barber et al., 2004).

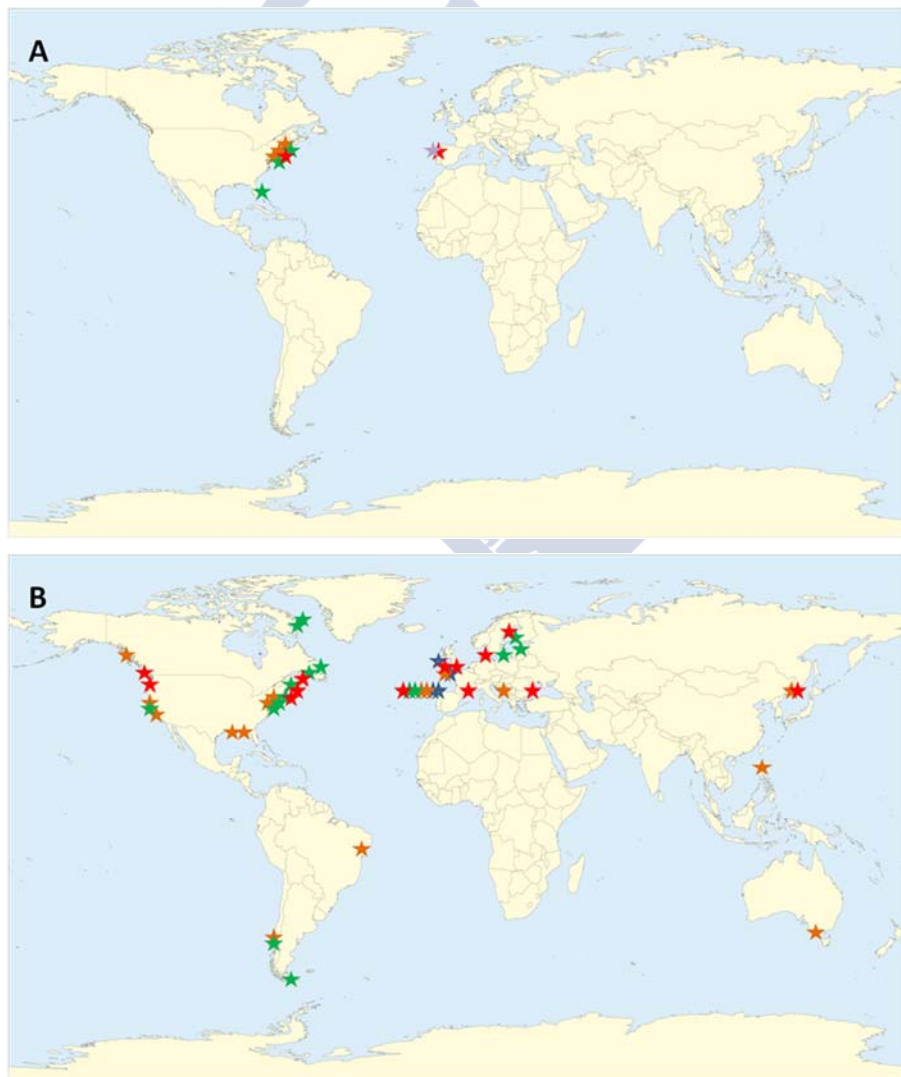


Figura 6: Distribución mundial de la neoplasia gonadal (A) y la neoplasia diseminada (B) en moluscos. Verde: almejas; azul: berberechos; naranja: ostras; rojo: mejillones; violeta: navajas.

1.4 Neoplasia gonadal

La neoplasia gonadal o germinoma se caracteriza por proliferación de células hipertrofiadas e indiferenciadas en los folículos gonadales (Elston et al., 1992). En estas células se detectan numerosas figuras mitóticas aunque no se observan tan frecuentemente como en la neoplasia diseminada (Barry y Yevich 1972; Hesselman et al., 1988). El tejido de origen de la neoplasia gonadal es el epitelio germinal (Barber et al., 2004). La enfermedad se detectó por primera vez en almejas *Mercenaria mercenaria* del este de EE. UU. (Yevich y Barry 1969). Hasta hoy se ha detectado en 9 especies de moluscos bivalvos (Tabla 2). La neoplasia gonadal no se puede diagnosticar “de visu”, ni por pruebas hemocitológicas (debido a que las células neoplásicas normalmente no están presentes en el sistema circulatorio); sólo se puede detectar a través de técnicas destructivas como histología y frotis de gónada, lo que dificulta su estudio. Esta enfermedad altera la gametogénesis y causa una reducción de la fecundidad (Barber, 2004), siendo mayor su prevalencia en hembras que en machos (Barry y Yevich, 1972, Hesselman et al., 1988; Bert et al., 1993; Barber, 1996). La neoplasia gonadal se ha asociado con mortalidades aunque en menor magnitud que la neoplasia diseminada (Barber et al., 2002).

Se desconoce la etiología de la neoplasia gonadal aunque se han propuesto varias hipótesis. Se ha sugerido un origen vírico, al detectarse inclusiones intranucleares similares a las producidas por herpes virus en células neoplásicas (Farley 1978, Harshbarger et al., 1979), aunque los experimentos de transmisión realizados han sido fallidos (Barber et al., 2002). Los germinomas se han asociado con contaminación ambiental por hidrocarburos (Barry y Yevich 1975; Yevich y Barszcz 1976, 1977; Harshbarger et al., 1979, Gardner et al., 1991) y herbicidas (Gardner et al., 1991). Se han propuesto bases genéticas moleculares de la enfermedad (Bert et al., 1993; Van Beneden et al., 1993).

Tabla 2: Distribución y frecuencia de casos de neoplasia gonadal en especies de moluscos bivalvos. S.I.: sin información.

Especie	Situación	Frecuencia Máxima (%) (tamaño de muestra)	Referencia
<i>Crassostrea virginica</i>	Bahía de Delaware, EE. UU.	2 (50)	Farley (1976)
	Maryland, EE. UU.	0,01 (20000)	Harshbarger et al. (1979)
	Connecticut, EE. UU.	0,2 (420)	Gardner et al. (1988)
<i>Ensis arcuatus</i>	Galicia, España	21 casos (S.I.)	Peters et al. (1994)
		10 (S.I.)	Darriba et al. (2006)
<i>Mercenaria campechiensis</i>	Indian River, Florida,	11,8 (85)	Bert et al. (1993)
	EE. UU.	S.I.	Arnold et al. (2004)
Híbridos de <i>Mercenaria</i> spp.	Indian River, Florida	21,6 (348)	Bert et al. (1993)
	EE. UU.	S.I.	Van Beneden et al. (1994)
		S.I.	Arnold et al. (2004)
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Rhode Island, EE. UU.	0,23 (1300)	Yevich y Barry (1969)
		2,7 (539)	Barry y Yevich (1972)
	Indian River, Florida, EE.UU.	6,5 (708) S.I.	Bert et al. (1993) Arnold et al. (2004)
<i>Mercenaria spp.</i>	Indian River, Florida,	11,6 (1263)	Hesselman et al. (1988)
	EE. UU.	20 (30)	Van Beneden et al. (1993)
		S.I.	Eversole y Heffernan (1995)
<i>Mya arenaria</i>	Maine, EE. UU.	S.I.	Yevich y Barszcz (1976)
		13 (S.I.)	Yevich y Barszcz (1977)
		22 (2400)	Harshbarger et al. (1979)
		33 (30)	Van Beneden et al. (1993)
		40 (S.I.)	Van Beneden et al. (1994)
		40 (S.I.)	Gardner et al. (1991)
		42,9 (S.I.)	Barber y Davis (1994)
		S.I.	Peters et al. (1994)
		26,7 (S.I.)	Barber (1996)
		50 (S.I.)	Barber et al. (2002)
<i>Mytilus edulis</i>	Nueva York, EE. UU.	1 caso (S.I.)	Peters et al. (1994)
	Galicia, España	6 (650)	Alonso et al. (2001)
		60 (1080)	Ruiz et al. (2011)

1.5 Neoplasia diseminada

MORFOLOGÍA

La neoplasia diseminada se caracteriza por proliferación de células hipertrofiadas en tejido conjuntivo y vasos y senos sanguíneos de numerosos órganos, con relación núcleo/citoplasma anormalmente elevada y con una frecuencia de figuras mitóticas alta (Peters 1988, Elston et al., 1992).

DISTRIBUCIÓN

El primer registro de neoplasia diseminada en bivalvos se debe a Farley (1969a) en ostras *Crassostrea virginica* de la costa de EE. UU y *Crassostrea gigas* de Japón. Posteriormente se ha descrito en más de 15 especies de bivalvos marinos de 4 continentes y de todos los océanos excepto el Antártico (Peters, 1988; Landsberg, 1996) (Fig. 3). Las prevalencias más altas se han detectado en las especies: *Mytilus trossulus*, *Cerastoderma edule* y *Mya arenaria* (Tabla 3).

Tabla 3: Distribución y frecuencia de casos en los que se ha detectado neoplasia diseminada en especies de moluscos bivalvos. S.I.: sin información.

Especie	Situación	Frecuencia máxima (%) (tamaño de muestra)	Referencia
<i>Cerastoderma edule</i>	Bretaña, Francia	46 (752)	Poder y Auffret (1986)
		S.I.	Auffret y Poder (1986)
	Galicia, España	13,6 (200)	Le Grand et al. (2010)
		84 (25)	Villalba et al. (2001)
		28 (30)	Carballal et al. (2001)
		S.I.	Romalde et al. (2007)
		S.I.	da Silva et al. (2005)
		S.I. (452)	Díaz et al. (2010)
		S.I.	Díaz et al. (2011)
		S.I.	Díaz et al. (2013)
		44 (25)	Díaz et al. (En revisión)
		12,4 (186)	Ruiz et al. (2013b)
	S.I.	Matias et al. (2014)	
	50 (S.I.)	Villalba et al. (2014)	
	Cork, Irlanda	S.I.	Collins y Mulcahy (2003)
60 (386)		Twomey y Mulcahy (1988a)	
40 (103)		Twomey y Mulcahy (1984)	
	94 (S.I.)	Twomey (1994)	

Especie	Situación	Frecuencia máxima (%) (tamaño de muestra)	Referencia
		6 (S.I.)	Morgan et al. (2012)
<i>Cerastoderma glaucum</i>	Galicia, España	1 caso	Rodríguez et al. (1997)
<i>Saccostrea glomerata</i>	Australia	3 casos	Wolf (1979)
<i>Crassostrea gigas</i>	Costa Oeste EE. UU. y Japón	1 caso (Miles)	Farley (1969a)
	Bahía de Pedro el Grande, Rusia	15 (210)	Odintsova et al. (2011)
	Galicia, España	S.I.	Iglesias et al. (2012)
<i>Crassostrea iredalei</i>	Dagupan, Filipinas	3 (S.I.)	De Vera et al. (2005)
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Bahía de Todos los Santos, Brasil	0,1 (986)	Nascimento et al. (1986)
<i>Crassostrea virginica</i>	Bahía de Chesapeake, EE. UU.	0,02 (30000) 0,1 (20000)	Farley (1969a) Harshbarger et al. (1979)
	Bahía Appalachicola, Florida, EE. UU.	0,1 (20000) 0,3 (373)	Harshbarger et al. (1979) Couch y Winstead (1979)
	Puerto Pascagoula, Mississippi, EE. UU.	0,02 (5000) 0,4 (4486)	Couch (1969) Couch (1985)
	Virginia, EE. UU.	8,4 (369)	Frierman (1976)
	New Haven, Connecticut, EE. UU.	0,1 (1400)	Newman (1972)
	Bahía de Delaware, New Jersey, EE. UU.	5 (834)	Ford et al. (1997)
<i>Ensis siliqua</i>	Galicia, España	0,3 (311)	Ruiz et al. (2013a)
<i>Macoma balthica</i>	Maryland, EE. UU.	.	Peters (1988)
	Bahía de Chesapeake, EE. UU.	10 (812)	Christensen et al. (1974)
	Golfo de Gdansk, Polonia	26,7 (234)	Smolarz et al. (2005a)
	Golfo de Riga, Letonia	15,7 (300)	Smolarz et al. (2005b)
		31 (S.I.)	Smolarz et al. (2005c)
		20 (50)	Smolarz et al. (2006)
		S.I. (500)	Peters y Lehtonen (1997)
	Tammisaari, Finlandia	26 (1748)	Pekkarinen (1993)
<i>Macoma calcárea</i>	Isla Baffin, Canadá	0,2 (519)	Neff et al. (1987)
<i>Macoma inquinata</i>	Bahía de Yaquina, Oregon, EE. UU.	5 (S.I.)	Farley (1976)
<i>Macoma nasuta</i>	Bahía de Yaquina, Oregon, EE. UU.	5 (S.I.)	Farley (1976)
<i>Mya arenaria</i>	Freeport, Maine, EE. UU.	10,9 (400)	Yevich y Barszcz (1976)
		22 (S.I.)	Yevich y Barszcz (1977)

Especie	Situación	Frecuencia máxima (%) (tamaño de muestra)	Referencia
	Annisquam River, Massachussetts, EE. UU.	20 (S.I.) 12 (50)	Taraska y Böttger (2013) Farley (1976)
	Maine y New Jersey, EE. UU.	26 (702)	Brown et al. (1976)
	Maine y Rhode Island, EE. UU.	64 (S.I.)	Brown et al. (1977)
	Rhode Island, EE. UU.	S.I.	Reno et al. (1994)
	New Bedford Harbor, Massachussetts, EE. UU.	40 (3500) S.I.	Cooper et al. (1982a,b) Oprandy et al. (1981)
		S.I.	White et al. (1993)
		S.I.	Miosky et al. (1989)
		S.I.	Walker et al. (1981)
	Woods Hole, Massachussetts, EE. UU.	S.I.	Oprandy y Chang (1983)
		90 (407)	Reinisch et al. (1984)
		50 (886)	Leavitt et al. (1990)
		90 (54)	Dopp et al. (1996)
		8,6 (151)	Barker et al. (1997)
		68,4 (19)	Strandberg et al. (1998)
		S.I.	Kelley et al. (2001)
		S.I.	Stephens et al. (2001)
		11 (S.I.)	Walker et al. (2006)
		5,6 (200)	Böttger et al. (2008)
		15,2 (S.I.)	Walker et al. (2009)
		S.I.	Reinisch et al. (1983)
		S.I.	Reinisch et al. (1984)
	Shrewsbury River, New Jersey, EE. UU.	19 (50)	Barber (1990)
	Yarmouth, Maine, EE. UU.	1,7(S.I.)	Taraska y Böttger (2013)
	Freeport, Maine, EE. UU.	5,3 (S.I.)	Taraska y Böttger (2013)
		S.I.	Barber (2004)
	Long Island Sound, Connecticut, EE. UU.	60 (3963)	Brousseau (1987)
		64,3 (211)	Brousseau y Baglivo (1991a)
	Chesapeake Bay, Maryland, EE. UU.	60,6 (2679)	Brousseau y Baglivo (1991b)
		S.I.	Brousseau y Baglivo (1994)
		65 (3584)	Farley et al. (1986)
		S.I.	Sunila y Farley (1989)

Especie	Situación	Frecuencia máxima (%) (tamaño de muestra)	Referencia
<i>Mya truncata</i>	Chesapeake Bay,	78 (S.I.)	McLaughlin et al. (1996)
	Maryland, EE. UU.	67 (S.I.)	Farley et al. (1991)
	Chester River, Maryland,		
	EE. UU.		
	Bahía de Fundy, Nueva	S.I.	Elsayed et al. (1999)
	Escocia, Canadá	37 (S.I.)	Dungan et al. (2002)
		31,3 (688)	Morrison et al. (1993)
	Charlottetown, Isla del	S.I.	Sunila (1991)
	Príncipe Eduardo, Canadá	S.I.	Sunila y Dungan (1992)
		>95 (S.I.)	McGladdery et al. (2001)
		S.I. (200)	AboElkhair et al. (2009a)
		23 (S.I.)	Siah et al. (2008)
		S.I.	Siah et al. (2011)
		S.I.	Delaporte et al. (2008b)
	<i>Mytilus chilensis</i>		11,1 (171)
		S.I. (300)	AboElkhair et al. (2012)
<i>Mytilus edulis</i>	Costa Este de Canadá	42 (60)	Delaporte et al. (2008a)
	Isla de Baffin, Canadá	0,4 (856)	Neff et al. (1987)
	Isla de Chiloé, Chile	4 (30)	Campalans et al. (1998)
	Canal Beagle, Argentina	13,3 (30)	Cremonte et al. (2011)
	Plymouth, R.U.	1,6 (994)	Lowe y Moore (1978)
	Southampton, R.U.	4,3 (4000)	Green y Alderman (1983)
		25 (S.I.)	Bignell et al. (2008)
	Isefjorden, Dinamarca	2,3 (8400)	Rasmussen (1986)
	Furuskar, Finlandia	4 (25)	Sunila (1987)
	Bahía de Yaquina, Oregon,	20 (2934)	Mix (1983)
	EE. UU.	10 (S.I.)	Mix et al. (1979)
	Puget Sound, Washington,	40 (40)	Elston et al. (1988)
	EE. UU.	30 (30)	Krishnakumar et al. (1999)
	Long Island Sound, Nueva	S.I.	Noël et al. (1991)
	York, EE. UU.	39 (10)	Kagley et al. (2003)
		1,5 (540)	Galimany y Sunila (2008)
	Pictou Harbour, Nueva	S.I.	Elston et al. (1988)
	Escocia, Canadá	56 (S.I.)	St-Jean et al. (2005)
<i>Mytilus trossulus</i>	Bahía de Yaquina, Oregon,	12 (100)	Farley et al. (1969b)
	EE. UU.		

Especie	Situación	Frecuencia máxima (%) (tamaño de muestra)	Referencia
	Puget Sound, Washington, EE. UU.	11 (660)	Moore et al. (1991)
	Isla de Vancouver, Canadá	29,2 (166)	Cosson-Mannevy et al. (1984)
	Burrard, Vancouver, Canadá	45 (278)	Bower (1989)
		45 (278)	Emmett (1984)
		42,8 (63)	Muttray et al. (2008)
	Isla del Príncipe Eduardo, Canadá	S.I.	Brown (1980)
		45 (S.I.)	Elston et al. (1992)
		S.I.	Farley et al. (1991)
		S.I.	Van Beneden (1994)
		30,2 (106)	Vassilenko et al. (2010)
		S.I.	McGladdery et al. (2001)
		S.I.	Kent et al. (1991)
	Bahía de Nakhodka, Rusia	4 (25)	Usheva y Frolova (2000)
	Bahía de Pedro el Grande, Rusia	2,8 (540)	Odintsova et al. (2011)
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Galicia, España	3 (30)	Figueras et al. (1991)
		5 (S.I.)	Fuentes et al. (2002)
	Costanta, Rumania	0,5 (200)	Ciocan y Sunila (2005)
	Lavera, Francia	0,2 (480)	Zorita et al. (2007)
	Southampton, R.U.	25 (S.I.)	Bignell et al. (2008)
<i>Ostrea chilensis</i>	Chiloé, Chile	6,3 (226)	Mix y Breese (1980)
		4,5 (30)	Rojas et al. (1999)
<i>Ostrea conchaphila/Ostrea lurida</i>	Bahía de Yaquina, Oregon, EE. UU.	14,2 (S.I.)	Mix et al. (1978)
	Bahía de San Francisco, EE. UU.	50 (60)	Friedman et al. (2005)
	British Columbia, Canadá	2 (60)	Meyer et al. (2010)
<i>Ostrea edulis</i>	Galicia, España	S.I.	Alderman et al. (1977)
		21,2 (S.I.)	da Silva et al. (2011)
		S.I.	Martín-Gomez et al. (2013)
		S.I.	Martín-Gomez et al. (2014)
		45 (30)	Figueras (1991)
	Mali-Ston, Croacia	35(S.I.)	Alderman et al. (1977)
	Bretaña, Francia	0,6 (28976)	Balouet et al. (1986)
<i>Ruditapes decussatus</i>	Galicia, España	3,3 (360)	Villalba et al. (1995)
<i>Saccostrea glomerata</i>	Australia	25 (S.I.)	Green et al. (2008)
		10 (S.I.)	Dang et al. (2013)
<i>Solen marginatus</i>	Galicia, España	S.I.	López et al. (2011)

Especie	Situación	Frecuencia máxima (%) (tamaño de muestra)	Referencia
		25 (S.I.)	Ruiz et al. (2015)
<i>Tagelus plebeius</i>	Bahía de Chesapeake, EE. UU. Maryland, EE. UU.	79 (S.I.)	Dungan et al. (2005)
<i>Polititapes aureus</i> *	Galicia, España	S.I. S.I. (182)	Manso et al. (2012) Carballal et al. (2013)

*nombre científico utilizado en el artículo *Venerupis aurea*.

ONTOGENIA

Los estudios sobre los tejidos de los que deriva la neoplasia diseminada de bivalvos no son concluyentes y la mayoría de estos tumores han sido considerados sarcomas. Se han utilizado varios términos para designar a estas neoplasias: neoplasia hemocitaria, sarcoma proliferativo, sarcoma diseminado, leucemia y otros, asumiendo un origen no demostrado (Elston et al., 1992). La observación de dónde se detectan las primeras células neoplásicas en el organismo o dónde se observa mayor actividad mitótica ha llevado a sugerir diferentes tejidos como originarios de estas células. La observación de actividad mitótica en el epitelio proliferativo de la gónada y la detección de células neoplásicas en este tejido condujeron a Farley a sugerir que la gónada podía ser el tejido de origen para los hemocitos normales y las células neoplásicas, además de los gametos (Farley, 1969a). Esta hipótesis fue apoyada por Rasmussen (1986), que observó que las células neoplásicas y los folículos gonadales parecían crecer a partir de pequeños focos celulares asociados con fibras de colágeno en el tejido conjuntivo vesicular.

La mayoría de los autores, sin embargo, apoyan un origen hemocitario, debido a las similitudes morfológicas entre células neoplásicas y hemocitos, y a la aparición de las células neoplásicas en el sistema circulatorio en las primeras etapas de la enfermedad (Farley, 1969b; Yevich y Barszcz, 1976; 1977; Mix, 1983; Balouet et al., 1986; McGladdery et al., 2001). La confirmación de esta hipótesis se ve dificultada por la falta de conocimiento de la hematopoyesis de bivalvos (Elston et al., 1990) pero experimentos realizados con diferentes especies de moluscos bivalvos afectados por la enfermedad neoplásica apoyan la hipótesis de un origen hemocitario (Mix, 1975; Smolowitz et al., 1989; Noël et al., 1991; Elston et al., 1992; Barber, 2004). La producción de anticuerpos específicos de células neoplásicas de *M. arenaria* (Reinisch et al., 1983, Smolowitz et al., 1989) y *M. trossulus* (Noël et al., 1991) y la detección de estos anticuerpos de hemocitos además de las células neoplásicas, sugiere la presencia de antígenos comunes, o bien contaminación por hemocitos en el inóculo inicial (Barber, 2004). El progreso de la enfermedad va asociado a una disminución de los hemocitos hialinocitos, lo que sería congruente con un origen hemocitario de las células neoplásicas (Peters, 1988; Elston et al., 1992). Mix (1975) inyectó ostras *Ostrea lurida* con timidina tritiada y observó que el porcentaje de células marcadas era mayor en individuos neoplásicos que sanos y las células marcadas se encontraban en el tejido conjuntivo de la mayoría de los órganos. La detección de los estados

iniciales de neoplasia diseminada en el epitelio branquial de *Macoma balthica* sugiere que éste podría ser su origen (Christensen et al., 1974) aunque Smolarz et al. (2005d) propone un origen hemocitario. En *Politapes aureus* (= *Venerupis aurea*) se han detectado los estados iniciales de la neoplasia en los tejidos conjuntivo y epitelial de las branquias (Carballal et al., 2013).

DIAGNOSIS

Histología

La neoplasia diseminada no se puede diagnosticar mediante examen externo de los especímenes. Los primeros moluscos diagnosticados como neoplásicos lo fueron mediante técnicas histológicas (Farley, 1969a,b; Yevich y Barszcz, 1976). Estas técnicas permiten realizar un estudio muy completo del individuo y evaluar si padece la enfermedad y con qué severidad, tejidos a los que afecta y en qué medida. La histología permite también la detección de la posible respuesta hemocitaria y otras características del individuo afectado, como el estado gonadal, sexo y otras patologías. Entre las desventajas de esta técnica está que la diagnosis se limita a cortes histológicos aislados y las observaciones morfológicas no siempre son evidentes en fases muy iniciales de la enfermedad; además es necesario sacrificar al individuo objeto de análisis, necesita un tiempo elevado de procesado y tiene un coste elevado.

Hemocitología

Debido a la característica de que en la neoplasia diseminada se detectan células neoplásicas en la hemolinfa del individuo afectado, se desarrollaron técnicas hemocitológicas de diagnosis no letales. Estas técnicas consisten en la extracción de hemolinfa, de la región pericárdica o músculo aductor, y su examen microscópico. Las primeras detecciones por este método sirvieron para diagnosticar neoplasia diseminada en *M. arenaria* y consistieron en observación en fresco de muestras de hemolinfa con microscopio de campo claro o de contraste de fases (Brown et al., 1976, 1977). Cooper et al (1982a), para facilitar la detección de células neoplásicas circulantes fueron los primeros en utilizar una tinción, Giemsa, y establecieron una escala de la severidad de la enfermedad basado en el número de células neoplásicas circulantes, utilizada posteriormente por otros autores. Debido a la tendencia a agregarse de las células de la hemolinfa, Reinisch et al. (1983) diluyeron las muestras de hemolinfa con agua de mar y pretrataron los portaobjetos con poli-L-lisina, para facilitar la adhesión de las células (las células neoplásicas tienen una capacidad de adhesión prácticamente nula).

Noël (1992) aplicó la técnica de cito-centrifugación (Bachère et al., 1988) para la diagnosis de la neoplasia diseminada, usando la disolución de Alsever como antiagregante, y la tinción con el kit comercial Hemacolor (Merk) para facilitar la detección de neoplasia diseminada en mejillón. Esta técnica se utilizó también para diagnosticar berberechos neoplásicos y almeja bicuda *Politapes aureus* (= *Venerupis aurea*) (Iglesias, 2006; Carballal et al., 2013).

Inmunoensayos

Se han generado anticuerpos monoclonales específicos de células neoplásicas de *M. arenaria* (Reinisch 1983, Smolowitz y Reinisch 1986, Miosky et al., 1989), y de mejillón *Mytilus edulis* y *M. trossulus* (Noël, 1991), que se han utilizado para diagnóstico de la neoplasia diseminada. Se ha conservado el hibridoma secretor del anticuerpo monoclonal murino IE11 específico de células neoplásicas de *M. arenaria* (Miosky et al., 1989; Smolowitz et al., 1989). Este anticuerpo reconoce una proteína de 200kDa situada en la membrana celular de estas células anómalas. Al clonarse este anticuerpo se denominó 1E10 y se comprobó que permite el reconocimiento de las células neoplásicas mediante diferentes técnicas inmunológicas como inmunocitofluorescencia (Barker et al., 1997), inmunocitoquímica (Kelley et al., 2001), “western blotting” (Stephens et al., 2001) y citometría de flujo (Delaporte et al., 2008b).

White et al. (1993) generaron un anticuerpo monoclonal 2A4 que reconoce una proteína 130kDa presente en la superficie celular de los hemocitos de *M. arenaria*, posiblemente asociada con la adherencia de estas células; comprobaron que el uso del anticuerpo es posible con técnicas de inmunocitofluorescencia, inmunocitoquímica, “western blotting” y citometría de flujo. Este anticuerpo combinado con el 1E10, permite realizar una prueba complementaria para la detección y cuantificación de células neoplásicas y por lo tanto un diagnóstico más acertado (Stephens et al., 2001).

St-Jean et al. (2005) usaron microscopía confocal para evaluar la utilidad de los anticuerpos monoclonales 1E10 y 2A4 generados a partir de células de hemolinfa de *M. arenaria* para el diagnóstico de mejillones neoplásicos *M. edulis*. Aunque con 2A4 no obtuvieron resultados satisfactorios, las células neoplásicas de mejillón reaccionaron con 1E10, confirmándose la existencia de un antígeno común entre las células neoplásicas de estas dos especies.

Citometría de flujo

La citometría de flujo permite evaluar cuantitativamente varios parámetros de un gran número de células en poco tiempo. Se ha incluido la citometría de flujo como técnica de diagnóstico, basándose fundamentalmente en las diferencias de contenido de ADN y tamaño celular entre hemocitos y células neoplásicas (da Silva et al., 2005). Esta técnica se ha utilizado para diagnosticar neoplasia en mejillones *Mytilus sp.* (Moore et al., 1991; Vassilenko and Baldwin, 2014), almejas *Macoma balthica* (Smolarz et al., 2005b, d) y *M. arenaria* (Delaporte et al., 2008a; Siah et al., 2008a,b, 2011, 2012b, 2013) y berberechos *C. edule* (Le Grand et al., 2010).

Delaporte et al. (2008b) diagnosticaron almejas *M. arenaria* neoplásicas mediante citometría de flujo, combinando la detección por aumento de material genético (ADN) con la reacción positiva de las células neoplásicas al anticuerpo monoclonal específico 1E10.

La utilización de una u otra técnica de diagnóstico dependerá de la especie a diagnosticar, de la finalidad de la diagnosis y del tiempo disponible. Las técnicas histológicas se han determinado como las más sensibles en estadios iniciales de la enfermedad, comparándolo con técnicas hemocitológicas (Cooper et al., 1982a; Carballal et al., 2013) y con citometría (Moore et al., 1991; Vassilenko y Baldwin, 2014), pero necesariamente conlleva el sacrificio del individuo objeto de análisis.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LAS CÉLULAS CIRCULANTES

Una de las principales funciones de los hemocitos en los bivalvos tiene que ver con la defensa. Los hemocitos son los encargados de detectar material extraño del entorno e inducir una respuesta inmune. Están implicados en el reconocimiento y en la eliminación de partículas extrañas mediante: secreción de factores humorales, encapsulación o fagocitosis, producción de especies reactivas de oxígeno y producción de enzimas hidrolíticas (Cheng, 1996; Chu, 2000). Al progresar la neoplasia diseminada, los hemocitos del individuo afectado son remplazados por células neoplásicas. Varios autores han estudiado cómo este remplazo celular podría afectar funcionalmente al organismo. De las características funcionales, una de la más estudiada ha sido la **fagocitosis**. Los primeros ensayos de fagocitosis en moluscos neoplásicos fueron realizados en *M. edulis* (Kent et al., 1989). En ellos se comparó la fagocitosis de los hemocitos frente a la de las células neoplásicas mediante dos métodos: un ensayo *in vitro* de fagocitosis con levaduras (zymosan) y un ensayo *in vivo* de aclaramiento de bacterias. En el ensayo *in vitro* se detectó que en los mejillones afectados con una intensidad alta de neoplasia, sólo un reducido número de células de la hemolinfa tenían capacidad fagocítica (0-13%), mientras que en los individuos con severidad ligera o moderada, el porcentaje de células de la hemolinfa con capacidad fagocítica (94-98%) fue similar al de los individuos sanos (92-96%). Para cuantificar el efecto del plasma en la capacidad fagocítica de las células, se repitió el ensayo añadiendo plasma de individuos afectados a células de individuos sanos y viceversa, comprobándose que el plasma no alteraba la capacidad de fagocitosis de las células. En el ensayo *in vivo* se obtuvieron resultados similares, mientras que mejillones sanos o en etapas iniciales de neoplasia retiraban más de un 90% de las bacterias inyectadas, los de fase avanzada de la enfermedad tan sólo retiraban el 44-83%. Resultados similares se obtuvieron con otras especies. En estudios realizados con *M. trossulus* se comprobó que, mientras los hemocitos ingerían alrededor de 20 partículas de zymosan, las células neoplásicas fagocitaban entre 1-2 partículas (Noël, 1991). Estos resultados se confirmaron con un ensayo en el que se mantuvieron en cultivo primario células neoplásicas de *M. trossulus* frente a hemocitos de *Mytilus spp.* (Noël, 1991); las células neoplásicas no alteraban su forma pero los hemocitos emitían pseudópodos rodeando a las células neoplásicas, las fagocitaban y las degradaban.

Beckmann et al. (1992) estudiaron la diferencia de adhesión y fagocitosis de levaduras entre hemocitos y células neoplásicas de almejas *M. arenaria* mediante microscopía electrónica. Tras 30 min, la media de los hemocitos que tenía alguna partícula adherida en la superficie o internalizada era del 5.5%, la de las células neoplásicas era del 0.14%. A los 60 min., mientras que un 6.3% de los hemocitos habían internalizado las partículas de levadura, no se observó ninguna célula neoplásica de cinco individuos neoplásicos que hubiera ingerido levaduras.

En berberechos *C. edule*, la actividad fagocítica se evaluó mediante citometría de flujo y se comprobó que el porcentaje de células de la hemolinfa de individuos neoplásicos con capacidad fagocítica era en torno a la mitad que en los berberechos sanos (Le Grand et al., 2013).

La diferencia de producción de **especies reactivas de oxígeno (ROIs)** entre hemocitos y células neoplásicas se ha estudiado en dos especies, con resultados discrepantes. Mientras que no se encontraron diferencias

significativas en la producción de ROIs entre células neoplásicas y hemocitos de *M. edulis* (Galimany y Sunila, 2008), en *C. edule* se ha detectado que la producción de ROIs por células neoplásicas es prácticamente el doble que la producida por hemocitos (Le Grand et al., 2013).

La diferencia de producción de **enzimas hidrolíticas** entre hemocitos y células neoplásicas se estudió en *M. arenaria* (Beckmann et al., 1992) y *M. trossulus* (Noël, 1991) mediante la estimulación con levaduras. Las células neoplásicas de *M. arenaria* mostraron mayor actividad de esterasas no específicas, fosfatasa ácida y β -glucuronidasa, mientras que los hemocitos mostraron actividad β -n-acetilglucosaminidasa, enzima no detectada en células neoplásicas (Beckmann et al., 1992). Para la evaluación de enzimas hidrolíticas en mejillón se utilizó el kit Apizym, que evalúa 19 enzimas hidrolíticas. Se detectó una actividad más elevada de la enzima cistina arilamidasa en células neoplásicas y mayor actividad de α -fucosidasa, β -glucuronidasa, α -glucosidasa y β -n-acetilglucosaminidasa en hemocitos. Estas tres últimas enzimas no se detectaron en las células neoplásicas (Noël, 1991).

La baja capacidad fagocítica de las células neoplásicas se ha podido explicar a partir cambios estructurales como **anomalías en el citoesqueleto** o en la composición lipídica de la membrana. Características de las células neoplásicas como no mantener contacto célula a célula, no adherirse al portaobjetos, no emitir filipodios y no poder fagocitar evidenciaron posibles anomalías en el citoesqueleto. Moore et al. (1992) estudiaron las diferencias estructurales de la actina en hemocitos y células neoplásicas de *M. arenaria* mediante microscopía electrónica. Mientras que en los hemocitos la actina está distribuida por la célula de forma organizada formando filamentos, en las células neoplásicas la actina se detecta en pequeños focos y en forma de una pequeña banda rodeando la región endoplasmática (Moore et al., 1992).

El papel que desarrolla la membrana celular en procesos de fusión de membrana (necesarios para efectuar la fagocitosis) y su conformación para aislar a la célula del medio, ha evidenciado posibles anomalías en su composición en las células neoplásicas. Le Grand et al. (2013) encontraron una disminución de **esteroles libres**, de **ácidos grasos 18:0, 16:1 n-7** y **fosfolípidos de membrana** en las células neoplásicas con respecto a los hemocitos.

Galimany y Sunila (2008) detectaron un descenso en el porcentaje de **células apoptóticas** en mejillones *M. edulis* neoplásicos y Martín-Gómez et al. (2013) constataron alteración en la expresión de genes relacionados con la apoptosis en ostras *Ostrea edulis* afectadas por neoplasia diseminada.

EPIDEMIOLOGÍA

La epidemiología estudia la evolución de la enfermedad a nivel poblacional. Los estudios epidemiológicos contemplan la distribución, abundancia e incidencia de las enfermedades, así como otros aspectos relacionados con la propagación de las mismas, como son la influencia de los factores ambientales y las interacciones entre el agente causal y hospedador. Los resultados de estos tipos de estudios son fundamentales para el desarrollo de métodos para el control y la prevención de enfermedades en el ámbito de la maricultura.

Variación temporal

En la mayoría de los estudios epidemiológicos de la neoplasia diseminada se han registrado variaciones estacionales (Elston et al., 1992). Se han registrado estas variaciones temporales en *M. trossulus* (Farley y Sparks, 1969; Farley, 1976; Mix, 1983; Cosson-Mannevy et al., 1984; Rasmussen, 1986), *O. lurida* (Farley y Sparks, 1969; Farley, 1976), *M. balthica* (Christensen et al., 1974; Wolowicz et al., 2005), *M. arenaria* (Cooper et al., 1982b; Brousseau, 1987; Barber, 1990; Leavitt et al., 1990; Farley et al., 1991; Böttger et al., 2013), *O. edulis* (Balouet et al., 1986; da Silva et al., 2011) y *C. edule* (Twomey y Mulcahy, 1988a; Le Grand et al., 2010).

En la Tabla 3 se muestran las prevalencias de neoplasia diseminada en diferentes especies. En este apartado se analizan los resultados de variaciones temporales de las especies en las que se han registrado las prevalencias más elevadas: *M. trossulus*, *M. arenaria* y *C. edule*. Mix (1983) estudió la variación de la neoplasia diseminada en mejillón *M. trossulus* en Yaquina Bay, Oregón, entre 1976 y 1981, y describió un aumento de la prevalencia a finales de otoño y comienzo del invierno. Cosson-Mannevy et al. (1984), estudiando tres poblaciones *M. trossulus* al sur de Vancouver, encontraron diferencias en los máximos de prevalencia entre las diferentes localizaciones, mientras una población mostraba su máximo de prevalencia en junio, en las otras dos se detectaba en septiembre.

Estudios realizados en poblaciones de *M. arenaria* muestran dos patrones diferentes de variación estacional. El primer patrón descrito se caracteriza por máximos de prevalencia en meses fríos (final de otoño- principio de invierno) y mínimos en los meses cálidos (finales de primavera-principio de verano) (Farley et al., 1986; Brousseau, 1987; Böttger et al., 2013). Sin embargo, otros autores describieron un ciclo bifásico con dos máximos uno en otoño y otro en primavera y dos mínimos uno en invierno y otro en verano (Cooper et al., 1982b; Barber, 1990). Leavitt et al., (1990), estudiando simultáneamente dos bancos de *M. arenaria* de la bahía de Buzzards (Massachusetts, EE. UU.) de mayo de 1986 a octubre de 1987, detectaron ambos patrones. Los autores asociaron la variación estacional monofásica a bancos con prevalencias bajas de neoplasia, y las variaciones bifásicas a bancos con prevalencias altas de neoplasia, explicando el segundo pico como consecuencia de fluctuaciones de la prevalencia debidas a la mortalidad de los individuos más enfermos.

Los estudios epidemiológicos realizados en berberecho *C. edule* muestran una variación estacional bifásica. Twomey y Mulcahy (1988a) realizaron muestreos mensuales durante dos años consecutivos (1983-1985) en Cork (Irlanda), encontrando un patrón estacional con máximos de prevalencia en los meses Junio y Noviembre y mínimos en invierno/inicio de primavera y al final del verano. Los análisis realizados en berberechos de la bahía Arcachon (Francia) durante el año 2007, mostraron picos de prevalencia en Febrero y en Mayo, mientras que la prevalencia más baja fue detectada en Junio. (Le Grand et al., 2010).

Las variaciones de la prevalencia de neoplasia diseminada siguiendo patrones estacionales se podrían explicar por la combinación de factores como la adquisición de la enfermedad por nuevos individuos, posible remisión y, fundamentalmente, por la muerte de los organismos afectados (Cooper et al., 1982b; Twomey y Mulcahy 1988a; Barber 1990; Elston et al., 1992).

Talla/edad

Es difícil establecer un patrón general sobre la influencia de la talla/edad del molusco en el desarrollo de la neoplasia diseminada. El primer estudio que asoció el tamaño con la susceptibilidad de padecer la enfermedad corresponde a almejas *Macoma balthica*, detectándose que un 10% de individuos de tamaño menor de 20 mm padecían la enfermedad, mientras que sólo en un 3% de individuos mayores de 20mm se detectaba neoplasia (Christensen et al., 1974).

Los estudios realizados en almejas *M. arenaria* revelan resultados contradictorios. Mientras algunos autores (Cooper et al., 1982b; Appeldoorn et al., 1984) describieron un mayor porcentaje de neoplasia en *M. arenaria* adulta que en almejas juveniles, otros autores (Leavitt et al., 1990; Potts, 1996; Böttger et al., 2013) observaron una edad intermedia en la que se alcanza la mayor prevalencia, y Yevich y Barszcz (1977) no encontraron relación entre la talla o edad y la neoplasia diseminada.

En ostra plana *O. edulis*, se ha detectado mayor susceptibilidad a padecer neoplasia diseminada en individuos mayores de 2,5 años (Balouet et al., 1986). Bower (1989) obtuvo resultados similares en *M. edulis*. Sin embargo, en esta misma especie, Brooks y Elston (1991) encontraron un mayor porcentaje de individuos enfermos en el primer año de vida comparándolos con mejillones de 2-3 años.

Las hipótesis que sostenían que la neoplasia diseminada estaba asociada al envejecimiento de los individuos actualmente están descartadas al detectarse juveniles con alta susceptibilidad (Brooks y Elston, 1991). Carballal et al. (en prensa) sugieren la posibilidad del estrés de la primera madurez como factor fisiológico que aumenta la susceptibilidad a padecer la enfermedad, mientras que el descenso de prevalencia detectado en individuos mayores puede ser debido a la muerte de los individuos enfermos más longevos (Böttger et al., 2013) o a mecanismos de resistencia biológica (Brooks y Elston, 1991).

Sexo

No está clara la relación del sexo con el desarrollo de la enfermedad. Varios estudios no han encontrado asociación entre el sexo de los individuos y la susceptibilidad a padecer neoplasia diseminada en *M. arenaria* (Brown et al., 1979; Potts 1996) en *Mytilis edulis* (Cosson-Mannevy et al., 1984) y *C. edule* (Morgan et al., 2012). Sin embargo, en otros estudios se ha detectado mayor porcentaje de hembras que machos con neoplasia diseminada en berberecho *C. edule* (Twomey y Mulcahy 1988a) y mayor susceptibilidad en machos de almeja *M. arenaria* (Brousseau y Baglivo, 1994).

Condición gonadal

Se ha propuesto que las variaciones de prevalencia de la neoplasia diseminada podrían ser causadas por el estrés al que se ven sometido los organismos durante la producción y liberación de gametos (Cooper et al., 1982b; Appeldorn et al., 1984; Balouet et al., 1986; Twomey y Mulcahy, 1988a; Barber, 1990; Böttger et al., 2013) sin aportar estimaciones de correlación de la prevalencia con la condición gonadal de los individuos.

Ford et al. (1997) estudiaron tal relación en ostras *Crassostrea virginica*; aunque la prevalencia de la enfermedad no era muy elevada (19/834), ésta sólo se diagnosticó cuando los individuos tenían gónada y

los máximos de prevalencia de la neoplasia diseminada se asociaron con el ciclo gametogénico, con un primer pico de prevalencia en el periodo de máximo desarrollo gonadal y un segundo pico después del mayor desove.

Factores ambientales

Varios autores han explicado las variaciones estacionales de prevalencia por la influencia de factores ambientales sobre el estado fisiológico del individuo. La tendencia general de prevalencias altas de neoplasia en meses fríos y bajas en meses de cálidos ha llevado a relacionar a la temperatura con la enfermedad (Cooper et al., 1982b; Twomey y Mulcahy 1988a; Barber 1990; Böttger et al., 2013).

Las temperaturas bajas detendrían la progresión de la enfermedad (Appeldorn et al., 1984) y, por lo tanto, la mortalidad asociada sería menor (Brown et al., 1977), lo que se traduciría en una mayor prevalencia en esos meses. Sin embargo, mediciones directas de temperatura mostraron que la mayor prevalencia de la enfermedad en almejas *M. arenaria* coincidía con los picos de menor temperatura (Leavitt et al., 1990). La temperatura también podría ejercer un efecto sobre la actividad de un posible agente etiológico y sobre la capacidad de defensa del hospedador (Twomey y Mulcahy 1988b, Barber 1990).

La salinidad es otra variable ambiental que varios autores han utilizado para explicar las variaciones de prevalencia, debido a que fluctuaciones bruscas de la salinidad podrían provocar situaciones de estrés en los organismos que podrían llevar a aumentar la prevalencia e intensidad de la enfermedad (Mix, 1983), aunque nunca se han correlacionado mediciones directas de salinidad con la neoplasia diseminada.

ETIOLOGÍA

Se han propuesto varias hipótesis para explicar la etiología de las enfermedades neoplásicas en bivalvos aunque las causas de la neoplasia diseminada en moluscos bivalvos no están claramente definidas (Baber 2004). La etiología de la neoplasia ha sido estudiada principalmente en las especies *M. arenaria* y *M. edulis*. Una hipótesis inicial, hoy en día completamente descartada, es que las células neoplásicas pudieran tratarse de una infección por el parásito ameboide *Labyrinthomyxa patuxent* (Mackin and Schlicht 1976).

Otros estudios relacionaron las neoplasias con efectos subletales de biotoxinas de dinoflagelados, debido a que la distribución temporal y espacial de mejillones y almejas con esta enfermedad coincidía con floraciones de estos dinoflagelados (Landsberg 1996); esta hipótesis no ha recibido soportes nuevos.

Las hipótesis con mayor soporte bibliográfico suponen que la neoplasia diseminada es causada por contaminantes o por un agente infeccioso.

Contaminación ambiental

La asociación de la enfermedad con la contaminación ambiental se ha basado en una alta correlación entre prevalencias elevadas de neoplasia y vertidos de petróleo, en el caso de *M. arenaria* (Yevich y Barszcz 1977, Brown 1980) y en *M. edulis* (Lowe y Moore 1978, Hillman et al., 1992) y con pesticidas organoclorados (Reinisch et al., 1984, Farley et al., 1991 y Gardner et al., 1991, Hillman et al., 1992) y metales pesados (Hillman et al., 1992, Böttger et al., 2013). En estudios recientes se ha asociado la prevalencia de neoplasia diseminada de *Mya arenaria* con los pesticidas asociados al cultivo intensivo de patatas en Prince Edward, Canadá. Se relacionó el aumento de prevalencias en estuarios afectados por la escorrentía proveniente de campos destinados al cultivo de patatas, la prevalencia aumentaba con la intensidad de cultivo de este tubérculo (Muttray et al., 2012). Sin embargo, en condiciones de laboratorio se expusieron almejas sanas a diferentes concentraciones de dos pesticidas (clortalonil y mancozeb), que no propiciaron el aumento de la aparición de la neoplasia con respecto a los controles (Pariseau et al., 2009). Sin embargo, otros estudios no hallaron evidencias de que la contaminación fuera la causa de la neoplasia diseminada, ya que no había diferencias de prevalencia entre zonas control y zonas contaminadas con hidrocarburos, para el caso de *M. arenaria* (Brown et al., 1977, Smolowitz y Leavitt 1996), *O. edulis* (Balouet 1986) y *M. trossulus* (Krishnakumar et al., 1999), o con bifenilos policlorados o metales pesados en el caso de *M. trossulus* (Krishnakumar et al., 1999). Los resultados de experimentos en laboratorio parecen indicar que los contaminantes podrían acentuar el desarrollo de la enfermedad causada probablemente por un agente infeccioso (Brown 1980 y Leavitt et al., 1994).

Agente infeccioso

La hipótesis de la implicación de un agente infeccioso tomó fuerza cuando se constató la transmisión de la enfermedad de individuos afectados a individuos sanos, en experimentos de cohabitación en tanques con *M. arenaria* (Brown 1980, McGladdery et al., 2001) y con *M. edulis* (Elston et al., 1988), en experimentos de campo con *M. arenaria* (Brousseau y Baglivo 1991b) y mediante la inoculación de hemolinfa de individuos enfermos a sanos con *M. arenaria* (Appeldorn et al., 1984; Weinberg et al., 1997; McLaughlin, 1994; Sunila, 1992; House et al., 1998; McGladdery et al., 2001), *M. edulis* (Elston et al., 1988) y *C. edule* (Twomey y Mulcahy, 1988b, Collins y Mulcahy 2003). La detección de partículas víricas en células neoplásicas de *M. arenaria* (Oprandy et al., 1981) dio lugar a la hipótesis de una etiología vírica. Esta hipótesis se vio reforzada al detectarse actividad transcriptasa inversa en células neoplásicas (Medina et al., 1993) y al conseguir la inducción de replicación viral con inyecciones de 5-bromodeoxiuridina en *M. arenaria* (Oprandy y Chang, 1983). Este mismo inductor fue utilizado para la activación de la neoplasia en almejas *M. arenaria* sanas procedentes de bancos con diferentes prevalencia de la enfermedad. En estos organismos se desarrolló neoplasia y además se encontró que había una correlación positiva entre la velocidad de desarrollo de la enfermedad y la prevalencia de neoplasia en los bancos de procedencia, produciéndose una inducción de la enfermedad más lenta en bancos con poca prevalencia de neoplasia (Taraska y Böttger, 2013).

La transmisión de la enfermedad por la inoculación de filtrados de homogenizados de células neoplásicas a individuos sanos, con la utilización de filtros (entre 0.45 o 0.22 μm) por los que pueden pasar virus pero no pasan bacterias, protistas o las propias células neoplásicas, refuerzan la hipótesis de etiología viral. Con este procedimiento fue posible la transmisión de neoplasia en *M. edulis* (Elston et al., 1988), *M. trossulus* (Kent et al., 1991), *C. edule* (Collins y Mulcahy 2003) y *M. arenaria* (Taraska y Böttger, 2013). Los experimentos realizados para transmitir la neoplasia entre especies diferentes de moluscos bivalvos no han sido exitosos (Kent et al., 1991). Romalde et al. (2007) y Manso et al. (2012) detectaron actividad transcriptasa inversa en tejidos de *C. edule* y *Polititapes aureus* (= *Venerupis aurea*), respectivamente, afectados por neoplasia diseminada, mientras que dicha actividad era mucho más baja o nula en individuos sanos, lo que sugiere sumado a la detección de partículas víricas condujo a proponer que un retrovirus podría ser causante de la enfermedad (Romalde et al., 2007). Sin embargo, los estudios realizados por AboElKahair et al. (2009a, 2009b, 2012) con la almeja *M. arenaria* cuestionan dicha hipótesis pues la actividad transcriptasa inversa podría ser debida a un factor endógeno y no a un retrovirus, apoyándose en que no detectaron partículas víricas con microscopía electrónica a pesar de la alta actividad transcriptasa inversa registrada. Siah et al. (2011), mediante hibridación supresiva sustractiva estudiaron la expresión diferencial de genes de almejas *M. arenaria* sanas frente a diferentes estadios de neoplasia diseminada, detectando niveles de transposasa y poliproteína en almejas con neoplasia significativamente superiores que en almejas sanas. Los autores sugieren la hipótesis de la implicación de una proteína tipo retrotransposón en el desarrollo de la enfermedad. Un elemento transposón de Piggy/Bac se detectó sobrepresado en ostras *O. edulis* con neoplasia diseminada (Martín-Gómez et al., 2013). La reciente detección de un retrotransposón denominado "Steamer" en células de hemolinfa de almejas neoplásicas *M. arenaria* (Arriagada et al., 2014) parece confirmar la hipótesis propuesta por Siah et al. (2011) de un retrotransposón responsable de la actividad transcriptasa inversa en almejas con neoplasia diseminada. La expresión de ARN de "Steamer" es muy elevada y el número de copias de ADN de "Steamer" está muy amplificado en las células neoplásicas. Es un miembro de la familia Gypsy/Ty3, con repetición terminal larga (LTRs) y transcripción inversa similar a la de los retrovirus y no codifica proteínas de envoltura. Analizando marcadores de tipo polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en ADN mitocondrial, marcadores microsatelites de ADN nuclear y la secuencia en la que se integra el retrotransposón "Steamer" en almejas *M. arenaria* neoplásicas de la costa atlántica de Canadá y varios estados de EE. UU. se comprobó que, para los tres tipos de factores analizados, las células neoplásicas eran diferentes de las células normales de las almejas enfermas y, lo que resulta incluso más sorprendente, se comprobó una enorme similitud para esos tres factores entre las células neoplásicas de almejas enfermas procedentes de todas las localizaciones geográficas analizada (Metzger et al., 2015). Por todo ello, estos autores postularon que el origen de la neoplasia diseminada en *M. arenaria* tiene un origen clonal, a partir de un solo individuo, y que el contagio se realiza por la transmisión de células neoplásicas de ese clon de individuos enfermos a individuos sanos, lo que sería factible por tratarse de individuos filtradores (Metzger et al., 2015). La transmisión de cáncer mediante células neoplásicas que "saltan" de individuos enfermos a sanos y proliferan en éstos, sólo se

había descrito anteriormente en dos tipos de cáncer de mamíferos: un tumor facial que padece el demonio de Tasmania (Pearse y Swift, 2006) y un tumor venéreo que afecta a perros (Murgia et al., 2006).

El artículo de Metzger et al. (2015) abre nuevas incógnitas: ¿Es posible que de *M. arenaria* se podría transmitir la neoplasia a otras especies con las que convive? ¿Tendrán un precursor común las especies susceptibles a la neoplasia diseminada de hábitats lejanos?

BASES MOLECULARES

Las publicaciones que versan sobre las bases moleculares de esta enfermedad en moluscos bivalvos han proliferado en los últimos años.

P53 y familia de p53

El gen supresor de tumores p53 y su expresión proteica han sido muy estudiados debido a sus múltiples funciones en la regulación del ciclo celular, apoptosis, mantenimiento de la estabilidad genética y su alta implicación detectada en cánceres humanos (Oren, 2003). Se ha secuenciado el gen p53 en *M. arenaria* (Barker et al, 1997; Kelley et al., 2001), *Spisula solidissima* (Cox et al., 2003), *M. edulis* (Ciocan y Rotchell, 2005; Muttray et al, 2007), *M. trossulus* (Ciocan et al., 2006; Muttray et al, 2007), *C. gigas* (Farcy et al., 2008), *M. galloprovincialis* (Stifanic et al., 2009) y *C. edule* (Ruiz et al., 2013b). En fase avanzada de la enfermedad se detecta la expresión de la proteína p53 mutada en almejas *M. arenaria*; secuenciando el gen de la proteína mutada se observó, en dos de cinco almejas estudiadas, una transición de citosina a guanina al final del exón 6, produciendo un cambio del aminoácido de ese codón de prolina a alanina (Barker et al, 1997).

Estudiando los niveles de expresión de la familia de la proteína p53 con anticuerpos específicos, en *M. arenaria* se encontró una expresión similar de p53 y p73 en células circulantes de individuos sanos y neoplásicos, aunque p97 no se detectó en las muestras de almejas neoplásicas (Stephens et al., 2001); a nivel tisular, las almejas neoplásicas mostraron una expresión superior de p53 en manto y de p73 en músculo aductor (Kelley et al., 2001). En este estudio se encontró una expresión diferenciada de la proteína p73 en las células de la hemolinfa entre las almejas sanas y neoplásicas. La expresión de estas proteínas en *M. edulis* varía con respecto a lo encontrado en *M. arenaria*, pues no se detectó la proteína p53 en células circulantes y la expresión de las proteínas p63, p73 y p97 es mayor en células de hemolinfa de mejillones neoplásicos (St-Jean et al., 2005).

Atendiendo a los niveles de ARNm, en *M. arenaria* Siah et al. (2008a) detectaron una expresión mayor de p53 y p73 en la fase intermedia de la enfermedad, mientras que Muttray et al. (2012) registraron una expresión mayor de p53 y p63/73 en la fase más avanzada de la enfermedad. En *C. edule*, en glándula digestiva se detecta una mayor expresión de p53 en individuos neoplásicos que no neoplásicos, alcanzándose los mayores niveles en etapas intermedias de la enfermedad (Ruiz et al., 2013b). La cuantificación del ARNm de p53 y la isoforma $\Delta Np63/73$ mostró niveles de ambos significativamente

superiores en células de las hemolinfa de mejillones neoplásicos *M. trossulus* con respecto a mejillones sanos, mientras que los niveles de TAp63/73 no variaban (Muttray et al., 2008, 2010).

Ubiquitina

La ubiquitina es una proteína que se une a proteínas celulares para su degradación. El proceso de conjugación de la ubiquitina a las diferentes proteínas se denomina ubiquitinación, e intervienen tres enzimas: E1 (activadora de la ubiquitina), E2 (cataliza la conjugación de la ubiquitina), E3 (ligasa que cataliza la unión ubiquitina-proteína). Esta ruta metabólica se ha relacionado con la degradación de p53 en enfermedades como el virus del papiloma humano (HPV) y cáncer cervical humano. En almeja *M. arenaria* Se ha secuenciado parcialmente el ADNc de la proteína E3, cuya secuencia es similar a la proteína E6AP relacionada con la degradación de p53 en el cáncer cervical humano (Kelley y Van Beneden, 2000), aunque estudios posteriores revelaron que esta proteína no se une al p53 de almejas neoplásicas (Olberding et al., 2004).

Mdm

La proteína mdm2 es otro regulador negativo de p53 en humanos. Se logró la inducción de mdm2 en una línea celular humana de cáncer de pulmón sin p53, con la transfección de un plásmido de p53 de *M. arenaria*. Sin embargo, la expresión de p53 en la línea celular fue mínima y no se detectó la expresión de los productos p21, ni Rb (Holbrook et al., 2009).

La secuencia de mdm en *M. trossulus* muestra que su estructura primaria es cercana a la de mdm2 y mdm4 de vertebrados. Se conservan regiones características de estas proteínas como el N-terminal de unión con p53, C-terminal de unión con zinc y en el dominio central se conservan 5 fosforilaciones (Muttray et al., 2010). Estos autores comprobaron que hay interacción entre p53-mdm en *M. trossulus* y que el nivel de ARNm de mdm es 5,8 veces superior en células neoplásicas que en hemocitos.

Ras

El protooncogen ras ha sido estudiado en moluscos por su transformación en oncogen en mamíferos provocando la estimulación de la célula a dividirse. La secuenciación de ADNc del gen ras en *M. edulis* muestra un elevado número de puntos con tendencia a sufrir mutaciones (puntos calientes) en los codones 12, 13, 59 y 61 (Ciocan y Rotchell, 2005). La secuencia parcial aislada del gen ras en *M. trossulus* sólo difiere en 6 nucleótidos, que no causan ningún cambio de aminoácidos, con la de *M. edulis* (Ciocan et al., 2006). Mientras que en hemocitos no se muestran variaciones polimórficas del gen ras, en las células neoplásicas se detectan mutaciones silenciosas en codones 13-15, 18-19, 21, 24-25, 70, detectándose la mayor variación en el primer exón, coincidiendo con el punto caliente del codón 13 (Ciocan et al., 2006). Se ha detectado mayor expresión del gen ras en *M. trossulus* con neoplasia avanzada que en mejillones sanos (Ciocan et al., 2006), sin embargo en un estudio posterior realizado con esta misma especie, se obtuvieron resultados contradictorios, el ARNm de gen ras en hemocitos fue 1,5 veces mayor que células neoplásicas (Muttray et al., 2010).

En muestras de glándula digestiva de berberechos *C. edule* neoplásicos se han detectado mutaciones del gen ras en los codones 15, 35, 55, 61, 65, 70, 77, 82, 89 y 93; siendo los niveles de transcripción de dicho gen significativamente superiores en berberechos con intensidad media de neoplasia (Ruiz et al., 2013b). La utilización de técnicas genómicas está ayudando a comprender el proceso de cáncer en invertebrados. La hibridación sustractiva supresiva (SSH) ha permitido detectar genes relacionados con la carcinogénesis en estudios sobre neoplasia diseminada en *O. edulis* (Martín-Gómez et al., 2013, 2014) y *M. arenaria* (Siah et al., 2011, 2012a, 2013). En el caso de *O. edulis* se ha detectado expresión diferenciada entre individuos afectados por neoplasia y sanos en genes relacionados con el ciclo celular: Gadd45, Rcc1, cyclin, Cdc42, SMC3 y PPA2; apoptosis: ProsN3, Rbx1 y THAP; inmunidad e inflamación: IκB, MMIF; señales de trasducción: Tetraspanin, Rab9, Trb, Lm3; elemento de transposición Pyggy Bac; y otros: PDIA, Farneosic Acido-Metiltransferasa. En el caso de *M. arenaria* se han detectado: Ras-Rho, Ras-C3, c-jun y c-myc (Siah et al, 2012a).







2. OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

Como se ha puesto de manifiesto en la introducción de esta memoria, la neoplasia diseminada es una de las enfermedades más serias, con mayor impacto económico, de las que afectan a los berberechos de Galicia, un recurso marisquero fundamental para esta región. En el momento de iniciar este estudio, el grupo de investigación sobre enfermedades de moluscos del CIMA había dedicado atención a esta enfermedad pero se consideró muy conveniente impulsar y reforzar su estudio. De esta forma, el objetivo principal del trabajo que aquí se presenta fue caracterizar la neoplasia diseminada que afecta a los berberechos *Cerastoderma edule* de la costa de Galicia, abordando cuestiones propias de las células neoplásicas, de los individuos afectados y poblacionales, con énfasis en aspectos epidemiológicos, para poder así evaluar el potencial destructivo de la enfermedad para el marisqueo en Galicia.

Este objetivo principal se desglosa en objetivos concretos que se detallan a continuación y que se distribuyen en los capítulos siguientes de esta memoria:

- Evaluar variaciones del contenido celular de ADN, frecuencia de apoptosis y cariotipo causados por la neoplasia diseminada.
- Evaluar la asociación de la neoplasia diseminada con los niveles de determinadas proteínas (p53 mut, Hsp70, Hsp 90) relevantes para la proliferación celular.
- Caracterizar la ultraestructura de las células neoplásicas y evaluar los efectos de la progresión de la enfermedad en diferentes parámetros celulares asociados a la respuesta inmunitaria.
- Etiología: evaluar el carácter transmisible de la enfermedad, la implicación de un retrovirus como agente etiológico y la asociación con contaminación por metales pesados.
- Caracterizar la progresión y los efectos de la neoplasia diseminada a nivel individual y la dinámica de la enfermedad a nivel poblacional.





3. ALTERACIONES DE LA PLOIDÍA, CARIOTIPO Y FRECUENCIA DE APOPTOSIS

3.1 La neoplasia diseminada provoca cambios en la ploidia y la frecuencia de apoptosis en berberechos *C. edule*.

3.2 Variación del cariotipo en células neoplásicas asociada a la intensidad de neoplasia diseminada en berberechos *C. edule*.



Díaz, S., Villalba, A., Insua, A., Soudant, P., Fernandez, J., Méndez, J., Carballal, M.J., 2013. Disseminated neoplasia causes changes in ploidy and apoptosis frequency in cockles *Cerastoderma edule*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 113, 214–219.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201113000517>





Matias, A. M., Díaz, S., Teixeira de Sousa, J., Villalba, A., Carballal, M. J., Leitão, A., 2014. Karyotype variation in neoplastic cells associated to severity of disseminated neoplasia in the cockle *Cerastoderma edule*. *Aquaculture*. 248-249, 233-225.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848614001203>







4. ALTERACIONES PROTEÍNICAS

4.1 Expresión de la proteína p53 mutada y las proteínas chaperonas Hsp 70 y Hsp 90 en berberechos *Cerastoderma edule* afectados por neoplasia.



Díaz, S., Cao, A., Villalba, A., Carballal, M.J. 2010. Expresión of mutant protein p53 and hsp70 and hsp90 chaperones in cockles *Cerastoderma edule* affected by neoplasia. *Disease of Aquatic Organism*. 90, 219-226.

<http://www.int-res.com/abstracts/dao/v90/n3/p215-222/>







5. CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS Y ALTERACIÓN DE PARÁMETROS INMUNITARIOS

5.1 Neoplasia diseminada en berberechos *Cerastoderma edule*: Caracterización ultraestructural y efectos en parámetros de las células de la hemolinfa.



Díaz, S., Renault, T., Villalba, A., Carballal, M.J. 2011. *Disseminated neoplasia in cockles Cerastoderma edule: ultrastructural characterisation and effects on haemolymph cell parameters*. Diseases of Aquatic Organisms. 96(2), 157-167.

<http://www.int-res.com/abstracts/dao/v96/n2/p157-167/>







6. TRANSMISIBILIDAD Y ETIOLOGÍA

6.1 Evaluación de la transmisibilidad de la neoplasia diseminada que afecta a los berberechos de Galicia y de su asociación con contaminación por metales pesados.

6.2 Evidencia de una etiología retroviral de la neoplasia diseminada de berberechos *C. edule*.

En este capítulo se incluyen dos artículos; el primero recoge los resultados incluidos en una comunicación presentada en el XI Congreso Nacional de Acuicultura (Díaz et al., 2007), sobre la transmisibilidad de esta enfermedad, al que se han añadido resultados de un experimento realizado para evaluar la asociación de la enfermedad con la contaminación por metales pesados y experiencias de transmisión interespecíficas. El segundo artículo, que aborda la relación de esta enfermedad con la detección de actividad transcriptasa inversa en los tejidos del berberecho, se publicó en 2007 en la revista *Journal of Invertebrate Pathology* y, como se tratará en la sección de Discusión General, el conocimiento derivado de estudios posteriores ha minado el soporte de los resultados de este artículo a la hipótesis de un retrovirus como agente etiológico de la neoplasia diseminada del berberecho.



Aetiology of the disseminated neoplasia affecting cockles *Cerastoderma edule* in Galicia (NW Spain): Assessment of disease transmissibility and evaluation of its association with heavy metal pollution.

Seila Díaz, Antonio Villalba, María J. Carballal

Centro de Investigacións Mariñas, Consellería do Medio Rural e do Mar da Xunta de Galicia, Aptdo. 13, 36620 Vilanova de Arousa, Spain

Abstract

Disseminated neoplasia (DN) reaches high prevalence in some Galician cockle *Cerastoderma edule* beds. The aetiology of this disease is unknown. Two hypothesis on the aetiology of DN, pollution and an infectious agent, which have been proposed for DN in other molluscs, were assessed. The concentration of Cu, Cd, Pb, Mn, Cr, Ni, Zn and Hg in tissues was determined in cockles from a bed with high DN prevalence and from a DN-free cockle bed. No evidence was found to support that heavy metal pollution can cause or strengthen disseminated neoplasia in Galician cockles. To evaluate the hypothesis of the involvement of an infectious agent, DN transmission was attempted by various procedures. The disease was transmitted to healthy cockles by co-habitation in tanks with DN-affected cockles, and by inoculation of intact neoplastic cells, but it was not transmitted by inoculation of a filtrate of homogenised neoplastic cells. No evidence of interspecific DN transmission, from cockles to clams, was found either from laboratory co-habitation trials or analysis of clams from beds with high cockle DN prevalence.

1. Introduction

Disseminated neoplasia (DN) has been detected in 23 species of marine bivalves with a world-wide geographical distribution (Carballal et al, in press). This disease has been detected in cockles *Cerastoderma edule* from the coast of Brittany (Poder and Auffret, 1986) and Ireland (Twomey and Mulcahy, 1988a; Collins and Mulcahy, 2003). This disease is widely distributed in cockle beds in the Galician coast (Carballal et al., 2001; Villalba et al., 2001). The cause of DN in bivalve molluscs is controversial (Baber, 2004; Carballal et al, in press). Pollution was proposed first, as association between high prevalence of neoplasia and contaminants was detected; that was the case of soft-shell clams *Mya arenaria* in places with oil spills (Yevich and Barszcz, 1977; Brown 1980) and blue mussels *Mytilus edulis* in association with oil spills (Lowe and Moore, 1978; Hillman et al., 1992), organochlorine pesticides (Reinisch et al., 1984, Farley et al., 1991; Gardner et al., 1991; Hillman et al., 1992) and heavy metals (Hillman et al., 1992). However, other studies did not find support for pollution as the cause of DN, because there were not differences in DN prevalence between control and polluted locations when assessing association of DN in *M. arenaria* (Brown et al., 1977; Smolowitz and Leavitt, 1996), *Ostrea edulis* (Balouet, 1986) and *Mytilus trossulus* (Krishnakumar et

al., 1999) with hydrocarbon pollution and that in *M. trossulus* with PCBs or heavy metals (Krishnakumar et al., 1999). The hypothesis of the involvement of an infectious agent was strengthened when the disease was transmitted from affected to healthy individuals in cohabitation experiments in tanks, for the cases of *M. edulis* and *M. arenaria* (Brown, 1980; Elston et al., 1988), in the field for *M. arenaria* (Brousseau and Baglivo, 1991), and by inoculation of haemolymph from diseased individuals into healthy ones in *M. edulis*, *M. arenaria* and *C. edule* (Elston et al., 1988; McLaughlin, 1994; Sunila, 1992; Twomey and Mulcahy, 1988b; Collins and Mulcahy, 2003). An eclectic hypothesis involved that contaminants could exacerbate the disease probably caused by an infectious agent (Brown 1980). The observation of viral particles in tumor cells *M. arenaria* (Oprandy et al. 1981) led to the hypothesis of a viral aetiology. This hypothesis was reinforced by detecting reverse transcriptase activity in neoplastic cells (Medina et al., 1993; Romalde et al., 2007; Manso et al., 2012). Furthermore, viral replication was induced in *M. arenaria* with injections of 5-bromodeoxyuridine (Oprandy and Chang, 1983) and the same inductor was used to activate neoplasia in clams *M. arenaria* from beds with different DN prevalence (Taraska and Böttger, 2013).

The hypothesis of viral aetiology was further tested by inoculating a filtrate (0.2 µm) of homogenised neoplastic cells into healthy individuals; transmission of DN by this procedure was reported in *M. edulis* (Elston et al., 1988), *M. trossulus* (Kent et al., 1991), *C. edule* from Ireland (Collins and Mulcahy, 2003) and *M. arenaria* (Taraska and Böttger, 2013). However, attempts to transmit DN to healthy cockles by cohabitation with DN-affected cockles failed (Twomey and Mulcahy 1998a). Attempts for mollusc interspecific DN transmission have been unsuccessful (Kent et al. 1991). Recently, DN transmission between soft-shell clams *M. arenaria* as contagious cancer cells has been demonstrated (Metzger et al. 2015).

The purpose of this article was to test two hypotheses on the aetiology of DN affecting Galician cockles. On the one hand, the association of DN with heavy metal pollution was addressed by analysing heavy metal concentration in cockles taken from two beds, one with high prevalence of DN and another DN-free bed. On the other hand, DN transmission to healthy cockles was attempted by cohabitation with DN-affected cockles, by inoculation of intact neoplastic cells, and by inoculation of a filtrate of homogenised neoplastic cells. Additionally, the possibility of DN transmission from affected cockles to clams was assessed by a cohabitation experiment and by histopathological analysis of clams collected from a shellfish bed with high DN prevalence in cockles.

2. Materials and Methods

2.1. Heavy metal pollution

2.1.1. Cockles

Cockles from a DN-free bed, located in Lira (Carnota, Galicia, NW Spain), and from another bed with high DN prevalence, located in Sarrido (Cambados, Ría de Arousa, Galicia) were collected in March 2009.

2.1.2 Diagnosis

Biopsy to perform non-lethal diagnosis involved taking a haemolymph sample from the posterior adductor muscle of each cockle, using a syringe with a needle, through a notch made in the shell with a carpenter rasp. The haemolymph was used to produce a cell monolayer onto a slide by cyto-centrifugation (92 x g, 5 min, 4 °C), which was fixed, stained with Hemacolor® (Merck) kit and examined with light microscopy for DN diagnosis. The cockles were ranked according to a scale of disease severity: Non-affected (N0), low severity (N1), moderate severity (N2), and high intensity (N3) (Díaz et al., 2010).

2.1.3. Analysis of heavy metal concentration

Three cockles from the DN-free bed and 3 cockles of each DN severity class (N0, N1, N2, N3) from the bed located in Sarrido were processed. After diagnosis, each cockle was stored at -80 °C. The analyses of heavy metal concentration in cockle tissues were performed in the *Centro de Apoyo Científico y Tecnológico a la Investigación* of the University of Vigo. Cockles were sucked, drained for 10 min. and weighed from 0.25 to 0.5 grams of tissues were digested with HNO₃ acid (Merck ultrapure) and H₂O₂ (Merck Suprapur) in an Anton Parr multiwave 3000. The digestion product was set in a 30 mL volume with MQ water. The contents of Cu, Cd, Pb, Mn and Cr in cockle tissues were analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Thermo X7); the Ni content was analysed by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS), (Thermo X7); the Hg content was determined by flow injection system with cold-vapour atomic absorption spectrometry (CV-AAS), (FIMS 400, Perkin-Elmer); and the Zn content was analysed by atomic absorption spectrometry (AAS-F), (Varian 250+) (Table 1). Ge, In and Tl were used as internal standards for the determination of trace elements by ICP-MS. Mussel tissue reference material (ERM-CE278, *European Institute for Reference Materials and Measurements, Belgium*) and blanks were used, which were processed and analysed simultaneously with the samples to check the quality of the results. All metal concentrations were expressed in dry weight.

Table 1: Techniques used for the determination of heavy metal concentration, detection limit (DL) and quantitation limit (CL).

Analyte	Technique	DL (mg/kg)	CL (mg/kg)
Hg	AAS-CV	0,02	0,06
Ni	ETAAS	0,15	0,40
Cu	ICP-MS	0,30	0,75
Zn	AAS-F	1,00	3,00
Cd	ICP-MS	0,02	0,04
Pb	ICP-MS	0,02	0,04
Mn	ICP-MS	0,15	0,40
Cr	ICP-MS	0,15	0,40

2.1.4. Statistical analysis

Differences in concentration of each heavy metal between cockle groups (cockles from the bed in Lira plus cockles of each severity class from the bed in Sarrido) were analysed by ANOVA, followed by Dunnett's t-test (significance at the 0.05 level), using SPSS 20 software.

2.2. Disease transmission

2.2.1. Biological materials

Cockles from a bed with high DN prevalence, located in Sarrido, and from another bed with low DN prevalence, located in Noia (Ría de Muros, Galicia), were collected in April 2004. Additionally, clams *Ruditapes decussatus* were taken from a shellfish bed located in Aldán Ría de Pontevedra, Galicia), where DN has never been detected. All those cockles and clams were used to perform disease transmission trials. Moreover, clams *R. decussatus*, *Venerupis corrugata* and *Ruditapes philippinarum* were collected from the shellfish bed located in Sarrido, with high cockle DN prevalence, and diagnosed for DN.

2.2.2. Diagnosis

A biopsy of every cockle used in the transmission trials was obtained and examined as explained above before the start of the trials. Additionally, cockles and clams found dead in the experimental trials and those that survived at the end of the trials were diagnosed with a standard histological procedure: a piece of tissue 5mm thick, including visceral mass, gill, mantle and foot was taken from each individual, fixed with Davidson's solution and embedded in paraffin. Five µm thick sections were stained with Harris' haematoxylin and eosin. Histological sections were examined with light microscopy. Cockles were classified according to a DN severity scale (Díaz et al., submitted). The clams taken from the bed located in Sarrido were also processed by this histological procedure for diagnosis.

2.2.3. Transmission trials

Four DN transmission trials were performed in laboratory conditions, three intraspecific (cockle to cockle) trials and one interspecific (cockle *C. edule* to clam *R. decussatus*) trial. Intraspecific trials included co-habitation of healthy and DN-affected cockles, inoculation of neoplastic cells into healthy cockles, and inoculation of a filtrate of homogenised neoplastic cells into healthy cockles. All the trials were performed in tanks; the tanks used in the co-habitation trials were supplied with seawater pumped from the sea in open circuit. In the inoculation trials, a closed circuit with filtered (0.22 μm) UV-sterilised, aerated seawater was used; cultured algae were supplied as food. The tanks were checked daily and moribund or dead individuals were taken and processed for diagnosis by histology. The trials ran until all the individuals died except in the intraspecific co-habitation trial that finished after 116 days, when some cockles were still alive.

2.2.3.1. Intraspecific transmission trial by co-habitation

Three tanks were used, one control tank (C1) with 25 non-affected cockles, and two “challenge” tanks (P1, P2) each enclosing 25 non-affected cockles and 15 DN-affected ones. At day 68 from the beginning of the trial, 3 new DN-affected cockles were added to the tank P1 and 11 to the tank P2 because most DN-affected cockles set at beginning had died. Different numbers of new DN affected cockles were added to each tank to the same ratio DN “donor” cockles/non-affected cockles.

2.2.3.2. Inoculation of neoplastic cells into healthy cockles

Four tanks were used, two control (C2, C3), and two “challenge” tanks (P3, P4). Thirty DN non-affected cockles were set in each tank. The cockles in the control tanks were injected in the adductor muscle, through a notch in the shell, with 0.1 ml of a suspension of cockle haemocytes (3×10^6 cells/ml) in filtered, autoclave-sterilised seawater; cockles in the “challenge” tanks were injected with 0.1 ml of a suspension of neoplastic cells (3×10^6 cells/ml) in filtered autoclave-sterilised sea water. The suspension of cockle haemocytes was produced by collecting and pooling haemolymph from healthy cockles (N0), whereas the suspension of neoplastic cells was produced by collecting and pooling haemolymph from DN-heavily affected cockles (N3); in both cases, the haemolymph was centrifuged (800 x g, 10 min, 4 °C) and the sediment (cell fraction) was used.

2.2.3.3. Inoculation of a filtrate of homogenised neoplastic cells

Four tanks were used, two control (C4, C5) and two “challenge” tanks (P5, P6). . Thirty DN non-affected cockles were set in each tank. The cockles in the control tank were injected in the adductor muscle with 0.1 ml of a filtrate of homogenised haemocytes from healthy cockles; cockles in the “challenge” tanks were injected with 0.1 ml of a filtrate of homogenised neoplastic cells. The filtrates of homogenised haemocytes and homogenised neoplastic cells were produced by collecting haemolymph from healthy cockles (N0) and from heavily affected cockles (N3), respectively; the haemolymph samples were centrifuged and the pellets

resuspended (3×10^6 cells/ml), as described above; then cells were sonicated, the resulting suspension was centrifuged ($3000 \times g$, 10 min., $4^\circ C$) and the supernatant was filtered ($0.45 \mu m$) under sterile conditions.

2.2.3.4. Interspecific transmission trial by co-habitation

Four tanks were used, two control tanks (C6, C7) with 30 clams each, and two “challenge” tanks (P7, P8) each having 30 clams plus 25 DN-affected cockles. The clams were kept in tanks after all cockles died to allow disease progress in clams if transmission had occurred.

2.2.4. Statistical analysis

Differences in survival between cockles DN severity stages in the intraspecific transmission trial by co-habitation were evaluated with the nonparametric linear Mantel-Cox test (significance at the 0.05 level) using SPSS 20 software.

3. Results

3.1. Heavy metal pollution

Mean concentrations of heavy metals in each cockle group are shown in Fig. 1. The highest values corresponded to the cockles from the DN non-affected bed in most cases. Concentration of Cd, Pb and Mn in cockles affected by neoplasia was significantly lower than that of cockles from the non-affected bed, except in the case of Pb, for cockles with moderate DN severity, and of Mn, in cockles with moderate and high severity. Scarce or null cases of significant differences were found for concentration of Ni, Cr, Hg and Zn. The only heavy metal for which concentration was significantly higher in DN-affected cockles was Cu.

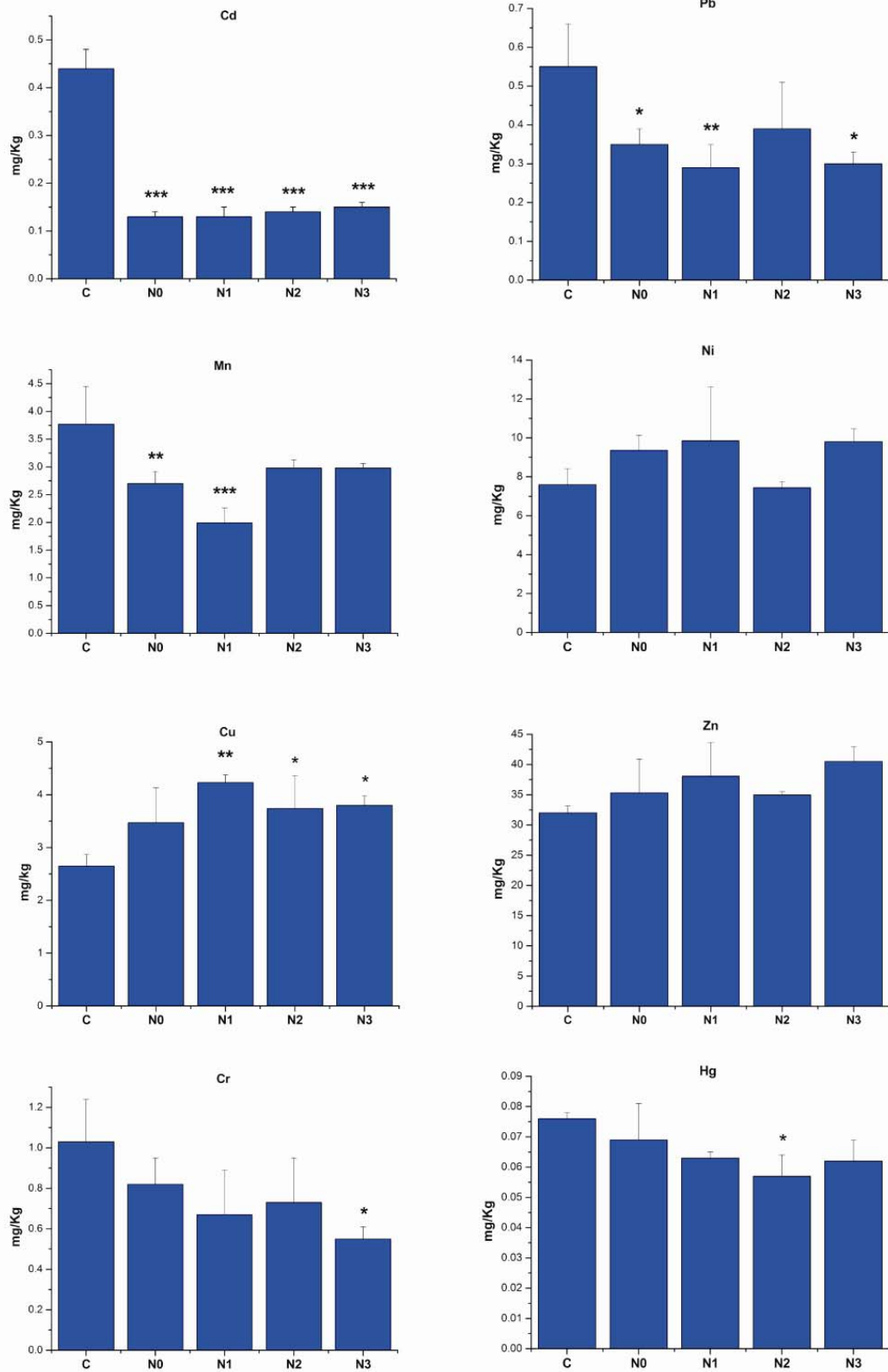


Fig. 1: Mean (\pm SD) concentration of heavy metals corresponding to each group of cockles. C: Cockles from the bed in Lira, a DN-free bed; N0: DN non-affected cockles from the bed in Sarrido; N1: cockles from Sarrido with light DN; N2: cockles from Sarrido with moderate DN; N3: cockles from Sarrido with heavy DN.

3.2. Disease transmission

No case of DN was detected in cockles of the control tank corresponding to the intraspecific transmission trial by co-habitation, whereas it was detected in 21% and 17% of the cockles initially diagnosed as non-affected in “challenge” tanks P1 and P2, respectively (Table 2); five of them showed light DN, 3 moderate DN and 1 heavy DN, while 3 cockles could not be processed because their tissues were too rotten. Regarding the evolution of DN severity in cockles that were already affected at the beginning of the trial, 89% of them showed the same severity when examined after death or at the end of the trial; DN severity increased in 8% of the cockles and decreased in one cockle (3%), from moderate to low severity. No case of absolute DN remission was found. This trial ran for 116 days.

Table 2: Results of transmission trials. A: clams; B: DN non-affected cockles; N: DN-affected cockles (donors).

Type of trial		Duration (days)	Tank code	Initial no. of individuals	Final diagnosis: No. DN-affected indiv. / No. examined indiv.
Intraspecific	Co-habitation	116	C1	25B	0/25
			P1	25B + 15 N	5/24
			P2	25B + 15 N	4/23
	Inoculation of neoplastic cells	32	C2	30B	0/28
			C3	30B	0/14
			P3	30B	3/21
			P4	30B	5/25
	Inoculation of filtrate of homogenised neoplastic cells	78	C4	30B	0/24
			C5	30B	0/24
			P5	30B	0/24
			P6	30B	0/21
	Interspecific	Co-habitation	273	C6	30A
C7				30A	0/30
P7				30A + 25N	0/28
P8				30A + 25N	0/29

Again, no case of DN was detected in cockles of the control tanks of the trial involving inoculation of neoplastic cells, whereas the disease was detected in 14% and 20% of the cockles in “challenge” tanks P3 and P4, respectively (Table 2). The first DN-affected cockle was detected 3 days after inoculation, with light DN severity. DN reached light severity in 4 cockles inoculated with neoplastic cells, moderate severity in 1 cockle and high intensity in 3 of them. This trial ran for 32 days and 32 cockles could not be diagnosed when removed from tanks because their tissues were too degraded.

No case of DN was detected in either cockles inoculated with a filtrate of homogenised neoplastic cells or in the corresponding controls (Table 2). This trial ran for 78 days and 27 cockles could not be diagnosed after removal from tanks because their tissues were too degraded.

The interspecific transmission trial by co-habitation ran for 273 days and no DN-affected clam was detected (Table 2). There were live cockles in the “challenge” tanks until day 165 from the beginning. Five clams could not be diagnosed because their tissues were too degraded.

Regarding the clams *R. decussatus*, *R. philippinarum* and *V. corrugata* taken from the shellfish bed located in Sarrido, cockle DN prevalence was high, none of the clams were found to be affected by DN.

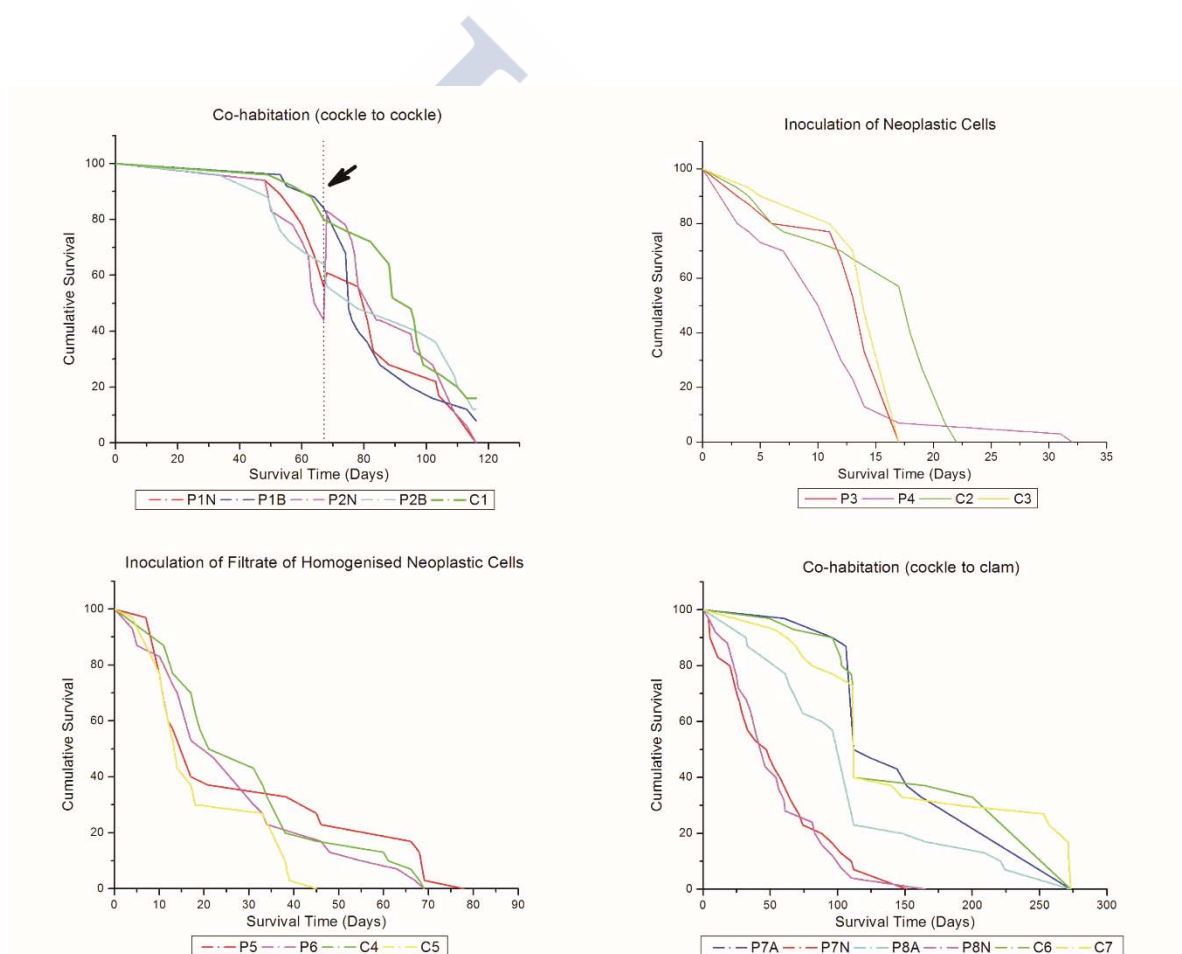


Fig. 2: Graphs showing the evolution of the cumulative survival of each group of cockles and clams in the transmission trials. Each group is identified with the code of the tank; a letter is added in the co-habitation trials to identify clams (A), cockles that were DN-affected at the beginning (B) and DN-affected cockles from the start (N). Arrowhead indicates addition of more neoplastic cockles to the tank.

In the intraspecific transmission trial by co-habitation, survival was significantly higher in the cockles that were diagnosed as DN non-affected before the start of the trial than in those with light and heavy DN (Fig. 3).

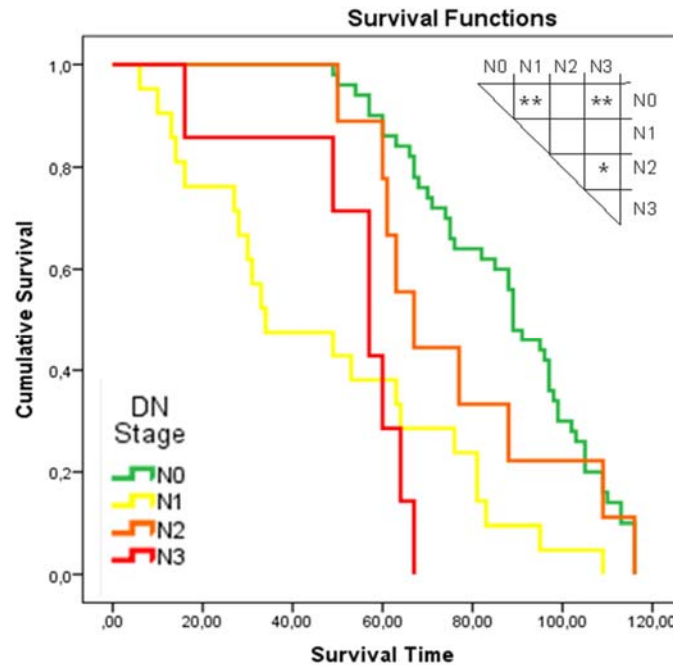


Fig. 3: Mantel-Cox survival curves through the intraspecific transmission trial by co-habitation corresponding to cockles of each class of DN severity, according to biopsies performed before the start of the trial. Survival time is shown in days. Significance of the differences between DN severity classes is shown in the upper right corner.

4. Discussion

No evidence was found to support that heavy metal pollution can cause or strengthen disseminated neoplasia in Galician cockles. The only heavy metal showing significantly higher concentration in DN-affected cockles than in non-affected ones was copper, which is less carcinogenic than other heavy metals included in the analysis. Thus, the results are not conclusive to support that an excess of copper can cause cancer in cockles. Copper is an essential metal for oxygen transport in shellfish, as it is integrated in the haemocyanin. Previous studies revealed values of Pb, Hg and Cu concentration in mussels from Galician Rías above the reference values of the OSPAR (Beiras et al., 2003). In the present study similar results were obtained for these metals. Ruiz et al. (2013) analysed organochlorine pesticides, PCBs, and phthalates in tissues of cockles from the bed located in Sarrido, finding low concentrations of these contaminants. The results of this study suggest that heavy metal pollution is not the direct cause of DN in cockles from Sarrido, although influence of Cu on DN progression cannot be discarded.

Results of the co-habitation trial support that DN can be transmitted from diseased to healthy cockles. Previous attempts of transmission of DN among cockles by cohabitation conducted in the field were

unsuccessful (Twomey and Mulcahy, 1988a). The transmission of DN by cohabitation of diseased and healthy individuals was demonstrated in *Mya arenaria* (Brown, 1980) and *Mytilus edulis* (Elston et al. 1988). Furthermore, the results support that the cancer was transmitted by inoculation of neoplastic cells in healthy individuals. It might be possible that neoplastic cells detected in inoculated individuals were the inoculated cells. Nevertheless, some of the inoculated cockles were diagnosed as having heavy DN severity, which could have only been achieved by the proliferation of neoplastic cells in the recipient individual. The experimental design did not allow determining whether the neoplastic cells proliferating in the inoculated individuals derived from the injected cells or they were transformed cells of the recipient cockles. Transmission of DN between cockles *Cerastoderma edule* via injection of hemolymph (whole or cell-fraction) had been performed by Twomey and Mulcahy (1988b) and Collins and Mulcahy (2003). However, DN transmission by inoculation of a filtrate of homogenised neoplastic cells was not detected in our trial. Twomey and Mulcahy (1988b) also failed transmitting DN into healthy cockles by this procedure, whereas Collins and Mulcahy (2003) reported transmission in two out of five attempts with a similar protocol. Transmission of DN into clams *M. arenaria* was also achieved by adding tissue homogenates from neoplastic clams to the water of tanks holding healthy clams (McGladdery et al. 2001).

Transmissibility of DN and the occurrence of epidemic outbreaks justify considering this disease as infectious. Which is the infectious agent responsible for DN in cockles and, in a broader sense, in molluscs? This study showed evidence of transmission with neoplastic cells, but attempts of DN transmission by inoculating a filtrate of homogenised neoplastic cells, which could have allowed the inoculation of a hypothetical virus infecting neoplastic cells, failed. Detection of reverse transcriptase activity associated with DN led to suggest retroviral aetiology for this disease in cockles (Romalde et al., 2007) and clams *Politapes aureus* (= *Venerupis aurea*) (Manso et al., 2012) from Galicia. Other authors questioned that detecting reverse transcriptase activity were enough to support retroviral aetiology of DN in molluscs, because that activity could be endogenous (AboElKahair et al., 2009a, 2009b, 2012). Siah et al., (2011) showed evidence of an endogenous retrotransposon involvement in DN of clams *M. arenaria*. Recently, a retrotransposon called "Steamer" has been characterised, which expression is correlated with DN in clams *M. arenaria* (Arriagada et al., 2014). Therefore, evidence other than reverse transcriptase activity would be needed to support viral aetiology. More recently, Metzger et al. (2015) have shown that DN is transmitted horizontally between clams *M. arenaria* as contagious cancer cells, which likely derived from a single original clam. Our results are also consistent with DN transmission between cockles as contagious cancer cells.

The significantly higher survival of cockles that were diagnosed as DN non-affected before the start of the co-habitation trial than that of cockles with light and heavy DN would support that that DN can cause cockle dead. Field studies support this statement (Díaz et al., submitted). Laboratory (Cooper et al., 1982) and field (Brousseau and Baglivo, 1991) experiments also showed higher mortality of DN-affected clams *M. arenaria* than that of non-affected ones.

No evidence of interspecific transmission of DN, from cockle to clams, was found in this study. Laboratory transmission attempt by co-habitation failed and no DN-affected clam was found in samples from the bed in Sarrido, where cockle DN has high prevalence. Previous studies detected DN in clams *R. decussatus* from Galicia with very low prevalence (Villalba et al. 1995). Other attempts of DN interspecific transmission have also failed (Kent et al., 1991).

Acknowledgments

The authors thank M. Angueira, E. Penas and M.I. Meléndez for technical assistance. This study was supported by funds from the Autonomous Galician Government (*Xunta de Galicia*) through the project PGIDIT06PXIB501132PR. S. Díaz was supported with a scholarship from the *Consellería do Medio Rural e do Mar da Xunta de Galicia*.

References

- AboElkhair, M., et al., 2009a. Reverse transcriptase activity associated with haemic neoplasia in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 84, 57–63.
- AboElkhair, M., et al., 2009b. Reverse transcriptase activity in tissues of the soft shell clam *Mya arenaria* affected with haemic neoplasia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 102, 133–140.
- AboElkhair, M., et al., 2012. Lack of detection of a putative retrovirus associated with haemic neoplasia in the soft shell clam *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 109, 97-104.
- Arriagada, G., et al., 2014. Activation of transcription and retrotransposition of a novel element Steamer in neoplastic hemocytes of the mollusk *Mya arenaria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 111, 14175-14180.
- Balouet, G., et al., 1986. Proliferative hemocytic condition in European flat oysters (*Ostrea edulis*) from Breton Coasts: A 6-Year Survey. *Journal of Invertebrate Pathology*. 48, 208-215.
- Barber, B.J., 2004. Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. *Aquatic Living Resources*. 17, 449-466.
- Beiras, R., et al., 2003. Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryolarval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. *Marine Environmental Research*. 56, 531-553.
- Brousseau, D.J., Baglivo, J.A., 1991. Field and laboratory comparisons of mortality in normal and neoplastic *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 57, 59-65.

- Brown, R.S., 1980. The value of the multidisciplinary approach to research on marine pollution effects as evidenced in a three - year study to determine the etiology and pathogenesis of neoplasia in the soft - shell clam, *Mya arenaria*. Rapports et Proces-verbaux des Réunions. Conseil International pour l'Exploration de la Mer. 179, 125-128.
- Brown, R.S., et al., 1977. Prevalence of neoplasia in 10 New England populations of the soft-shell clam (*Mya arenaria*). Annals New York Academy of Sciences. 298, 522-534.
- Carballal, M.J., et al., (In press). Neoplastic diseases of marine bivalves. Journal of Invertebrate Pathology.
- Collins, C.M., Mulcahy, M.F., 2003. Cell-free transmission of a haemic neoplasm in the cockle *Cerastoderma edule*. Diseases of Aquatic Organisms. 54, 61-67.
- Carballal, M.J., et al., 2001. Parasites and pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the coast of Galicia (NW Spain). Journal of Invertebrate Pathology. 78, 87-97.
- Cooper, K.R., et al., 1982. The course and mortality of a hematopoietic neoplasm in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. Journal of Invertebrate Pathology. 39, 149-157.
- Díaz, S., et al., (Submitted) Long term epidemiological study of disseminated neoplasia of cockles in Galicia (NW Spain): temporal patterns at individual and population levels, influence of environmental and cockle-based factors, and lethality. Journal of Fish Diseases.
- Díaz, S., et al., 2010. Expression of mutant protein p53 and Hsp70 and Hsp90 chaperones in cockles *Cerastoderma edule* affected by neoplasia. Diseases of Aquatic Organisms. 90, 219-226.
- Elston, R.A., et al., 1988. Transmission of Hemic neoplasia in the bay mussel, *Mytilus edulis*, using whole cells and cell homogenate. Developmental and Comparative Immunology. 12, 719-727.
- Farley, C.A., et al., 1991. Epizootiology and distribution of transmissible sarcoma Maryland soft shell clams, *Mya arenaria*, 1984-1988. Environmental Health Perspectives. 90, 35-41.
- Gardner, G.R., et al., 1991. Germinomas and teratoid siphon anomalies in softshell clams, *Mya arenaria*, environmentally exposed to herbicides. Environmental Health Perspectives. 90, 43-51.
- Hillman, R.E., et al., 1992. Relationship of environmental contaminants to occurrence of neoplasia in mussels (*Mytilus edulis*) from east and west coast Mussel Watch sites. Proceedings of the Marine Technology Society Journal. 1, 230-239.
- Kent, M.L., et al., 1991. Failure of transmission of hemic neoplasia of bay mussels, *Mytilus trossulus*, to other Bivalve Species. Journal of Invertebrate Pathology. 57, 435-436.
- Krishnakumar, P.K., et al., 1999. Environmental contaminants and the prevalence of hemic neoplasia (leukemia) in the common mussel (*Mytilus edulis* Complex) from Puget Sound, Washington, USA. Journal of Invertebrate Pathology. 73, 135-146.
- Lowe, D.M., Moore, M.N., 1978. Cytology and quantitative cytochemistry of a proliferative atypical hemocytic condition in *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mollusca). Journal of the National Cancer Institute. 60, 1455-1459.
- Manso, C.F., et al., 2012. Detection of reverse transcriptase activity in golden carpet shell clams (*Venerupis aurea*) with disseminated neoplasia. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 32, 56-63.

- McGladdery, S.E., et al., 2001. Haemic neoplasia in soft-shell clams (*Mya arenaria*): recent outbreaks in Atlantic Canada and discovery of a p53 gene homologue associated with the condition. *Bulletin of Aquaculture Association*. 101(3), 19-26.
- McLaughlin, S.M., 1994. Transmission studies of sarcoma in the softshell, *Mya arenaria*. In: *Invertebrate Neoplasia: Initiation and Promotion Mechanisms*. Rosenfield, A., Kern, F.G. & Keller, B.J. (Ed.). U.S. Department of Commerce, Woods Hole, MA. pp. 21-22.
- Medina, D.J., et al., 1993. Isolation of infectious particles having reverse transcriptase activity and producing hematopoietic neoplasia in *Mya arenaria*. *Journal of Shellfish Research*. 12, 112–113.
- Metzger, M.J., et al., 2015. Horizontal transmission of clonal cancer cells causes leukemia in Soft-Shell Clams. *Cell*. 161, 255–263.
- Oprandy, J.J., Chang, P. W., 1983. 5-Bromodeoxyuridine Induction of Hematopoietic Neoplasia and Retrovirus Activation in the Soft-Shell Clam, *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 42, 196-206.
- Oprandy, J.J., et al., 1981. Isolation of a viral Agent Causing Hematopoietic Neoplasia in the Soft-Shell Clam, *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 38, 38-45.
- Poder, M., Auffret, M., 1986. Sarcomatus lesion in the cockle *Cerastoderma edule* L. Morphology and population survey in Brittany, France. *Aquaculture*. 58, 1-8.
- Reinisch, C.L., et al., 1984. Epizootic neoplasia in soft shell clams collected from New Bedford Harbor. *Hazard Waste*. 1, 73-81.
- Romalde, J.L., et al., 2007. Evidence of retroviral etiology for disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 94, 95-101.
- Ruiz, P., et al., 2013. Biomarkers and transcription levels of cancer-related genes in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain) with disseminated neoplasia. *Aquatic Toxicology*. 136-137, 101-111.
- Siah, A., et al., 2011. Induction of transposase and polyprotein RNA levels in disseminated neoplastic hemocytes of soft-shell clams: *Mya arenaria*. *Developmental and Comparative Immunology*. 35, 151–154.
- Smolowitz, R., Leavitt, D., 1996. Neoplasia and other pollution associated lesions in *Mya arenaria* from Boston Harbor. *Journal of Shellfish Resource*. 15, 520.
- Sunila, I., 1992. Serum-cell intractions in transmission of sarcoma in the soft shell clam, *Mya arenaria* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 102A, 727-730.
- Taraska, N.G., Böttger, S.A., 2013. Selective initiation and transmission of disseminated neoplasia in the soft shell clam *Mya arenaria* dependent on natural disease prevalence and animal size. *Journal of Invertebrate Pathology*. 112, 94-101.
- Twomey, E., Mulcahy, M.F., 1988a. Epizootiological aspects of a sarcoma in the cockle *Cerastoderma edule*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 5, 225-238.
- Twomey, E., Mulcahy, M.F., 1988b. Transmission of a sarcoma in the cockle *Cerastoderma edule* (Bivalvia; Mollusca) using cell transplants. *Developmental and Comparative Immunology*. 12, 195-200.

- Villalba, A., et al., 1995. Disseminated sarcoma in the clam *Ruditapes decussatus* in Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*. 65, 76-78.
- Villalba, A., et al., 2001. Disseminated neoplasia and large foci indicating heavy haemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*. 46, 213-216.
- Yevich, P.P., Barszcz, C. A., 1977. Neoplasia in soft-shell clams (*Mya arenaria*) collected from oil-impacted sites. *Annals New York Academy of Sciences*. 409-426.





Romalde, J.L., Vilaño, M.L., Beaz, R., Rodríguez, J.M., Díaz S., Villalba, A. Carballal M.J. 2007. Evidence of retroviral etiology for disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*). *Journal Invertebrate Pathology*. 94, 95-101.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201106001923>







7. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS: DINÁMICA TEMPORAL, INFLUENCIA DE FACTORES ENDÓGENOS Y EXÓGENOS Y LETALIDAD DE LA ENFERMEDAD

7.1 Estudio epidemiológico prolongado de la neoplasia diseminada de berberechos *Cerastoderma edule* (L.) en Galicia (NW España): evaluación de patrones temporales a nivel individual y poblacional, influencia de factores ambientales y de factores propios de los berberechos y letalidad.



Díaz, S., Iglesias, D., Villalba, A., Carballal, M.J. (En revisión) Long term epidemiological study of disseminated neoplasia of cockles in Galicia (NW Spain): temporal patterns at individual and population levels, influence of environmental and cockle-based factors, and lethality. *Journal of Fish Diseases*.







8. DISCUSIÓN GENERAL



8. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados de este estudio suponen un avance en el conocimiento de la neoplasia diseminada que afecta a los berberechos *Cerastoderma edule* de la costa gallega. La neoplasia diseminada en berberecho, como es común en los cánceres, rompe con las reglas básicas del comportamiento celular en organismos pluricelulares. Las células neoplásicas son células desdiferenciadas, muy activas y en continua división. Este estudio abordó algunas de las alteraciones a nivel celular propias de esta enfermedad.

Las células neoplásicas son genéticamente inestables. La inestabilidad de los cromosomas es una de las mayores formas de inestabilidad genética. Los resultados mostraron que las células neoplásicas del berberecho son aneuploides, con un contenido de ADN superior al de las células normales, lo que morfológicamente se traduce en núcleo de gran tamaño. Se comprobó que las células neoplásicas contienen un número anormal de cromosomas que, además, desarrollan anomalías estructurales. En intensidades medias de neoplasia (N2) todavía se conserva un alto porcentaje de cromosomas con su homólogo, sin embargo, en intensidades altas (N3) aumenta la inestabilidad cromosómica, lo que se manifiesta en un número considerable de estructuras cromosómicas pequeñas, sin centrómero, similares al cromosoma doble diminuto tan frecuente en leucemias humanas (Thomas et al., 2004), que en los artículos sobre cromosomas (sección 3) se denominaron erróneamente microcromosomas (los microcromosomas tienen centrómero). Tal como se ha descrito en leucemias humanas, los cromosomas de tipo doble diminuto pueden acumular copias mutadas numerosas de proto-oncogenes o genes supresores de tumores, explicando así la alteración del ciclo celular y la mitosis continuada.

Precisamente, la acumulación de mutaciones en proto-oncogenes y genes supresores de tumores es otra de las manifestaciones de la inestabilidad genética de las células neoplásicas. Las proteínas que actúan en la regulación negativa, en el ciclo celular, son las llamadas proteínas supresoras de tumor y una de las más importantes es la p53. La proteína p53 regula la expresión de determinados genes cuando se produce un daño o una mutación del genoma. Su función fundamental es inhibir la proliferación celular y evitar que estas mutaciones se transmitan a las células hijas, por lo que puede activar la parada del ciclo celular o bien provocar la muerte celular por apoptosis si no se puede reparar el daño genético. En los berberechos afectados por neoplasia diseminada se detectó proteína p53 mutada, que se mantenía en el citosol, siendo más abundante en las etapas avanzadas de la enfermedad. Si p53 está mutada y localizada en el citoplasma (sin acceder al núcleo), no puede ejercer sus funciones. La proteína p53 mutada puede permanecer estable en el citoplasma mediante la formación de complejos con miembros de la familia de las Hsp70 y Hsp90 evitando así su ubiquitinización. También se detectó mayor expresión de Hsp70 y Hsp90 en el citoplasma en berberechos afectados por neoplasia diseminada.

La pérdida de la funcionalidad de p53 conduce la proliferación sin freno de las células neoplásicas. De forma coherente, los resultados sobre apoptosis de este estudio muestran la caída de apoptosis asociada a la neoplasia diseminada del berberecho. En muestras de hemolinfa se observó una disminución significativa de células en apoptosis en las fases avanzadas de la enfermedad (N2 y N3) con respecto a los individuos

sanos, por tanto en las fases con niveles sobreelevados de proteína p53 mutada. En cortes histológicos se detectó una disminución significativa de células en apoptosis en la etapa de neoplasia diseminada intensa (N3). Atendiendo al tipo celular, los análisis de las muestras de hemolinfa revelaron que el porcentaje de hialinocitos y granulocitos apoptóticos no variaba con la progresión de la enfermedad, por lo que el descenso detectado en el porcentaje de células en apoptosis era debido al aumento de las células neoplásicas, que entran en apoptosis en mucha menor proporción que los hemocitos normales. Los resultados correspondientes al artículo de la sección 5 muestran que la mortalidad de los hemocitos es mayor que la mortalidad de células neoplásicas en todas las etapas de la enfermedad y hay un aumento significativo de mortalidad de hemocitos en intensidades altas (N2+N3). Este aumento de mortalidad puede ser atribuido al estrés y disfunción generalizada (destrucción de la arquitectura histológica y anatómica, incremento acusado de la densidad celular de la hemolinfa, lo que dificulta enormemente la circulación y puede provocar embolismo) provocados por la proliferación de células neoplásicas, con alteración de la composición del plasma (caída de los niveles de oxígeno y nutrientes).

El análisis de la progresión de la enfermedad a nivel individual mostró que las células neoplásicas se distribuyen por el circulatorio e invaden el conjuntivo de varios órganos, pudiendo devenir en invasión generalizada. Aunque no se ha demostrado de forma inequívoca que las células neoplásicas deriven de hemocitos o se originen en la línea hemopoyética, se comprobó que los hemocitos viables disminuyen con la progresión de la enfermedad. Los hemocitos desempeñan un papel clave en la respuesta inmunitaria; los resultados mostraron una alteración progresiva de parámetros asociados con la respuesta inmune en las células presentes en la hemolinfa con el avance de la enfermedad, lo que ha de traducirse en una pérdida de la capacidad inmunitaria. La propia morfología de las células neoplásicas muestra la carencia de pseudópodos, coherente con la escasa capacidad fagocítica y el bajo contenido en actina en comparación con los hemocitos normales. El elevado número de mitocondrias y la presencia de uno o más nucleolos es coherente con una elevada actividad celular (generación de energía y síntesis proteica), necesaria para la proliferación de las células neoplásicas.

Transcendiendo el nivel individual, en este estudio se confirmó la transmisión de la neoplasia diseminada de berberechos enfermos a sanos, lo que ya se había observado en experimentos realizados con berberechos en Irlanda (Twomey y Mulcahy, 1988b, Collins y Mulcahy 2003) y en el caso de la almeja *M. arenaria* (Brown 1980; Appeldorn et al., 1984; Brousseau y Baglivo 1991; McLaughlin, 1994; Sunila, 1992; Weinberg et al., 1997; House et al., 1998; McGladdery et al., 2001 y Taraska y Böttger, 2013). En definitiva, esta enfermedad tiene una dinámica propia de una enfermedad infecciosa, aunque en el momento de iniciar este estudio se ignoraba su etiología. La dinámica infecciosa de esta enfermedad es coherente con el descenso acusado de su prevalencia registrado en este estudio en el banco de Misela, tras un episodio de lluvias torrenciales que conllevó a un descenso brusco de la salinidad y mortalidad masiva de la población de berberechos; al morir muchos individuos afectados (reducción del número de “donantes”) y con la disminución drástica de la densidad de berberechos en el banco, es muy probable que la transmisión de la enfermedad se hiciese mucho más difícil. Teniendo en cuenta la hipótesis de que un retrovirus era el agente etiológico de la neoplasia diseminada de *M. arenaria*, sustentada en buena medida por la detección

de transcriptasa inversa en las almejas enfermas (Medina et al., 1993), se decidió evaluar si en el caso del berberecho, también la neoplasia diseminada estaba asociada a la actividad transcriptasa inversa; la confirmación de esta asociación junto con la observación esporádica con microscopía electrónica de transmisión de estructuras semejantes a retrovirus llevó a considerar que había evidencias muy consistentes de etiología retroviral. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que la actividad transcriptasa inversa en moluscos con neoplasia diseminada no tiene por qué deberse a retrovirus, habiéndose demostrado en el caso de *M. arenaria* que dicha actividad se debe a un retrotransposón del que existen muchas copias en las células neoplásicas de almejas enfermas (Arriagada et al., 2014); por tanto, la etiología retroviral de la neoplasia diseminada del berberecho no se puede decir que esté demostrada. El esclarecedor artículo de Metzger et al. (2015) en que se demuestra que la expansión de la neoplasia diseminada en almejas *M. arenaria* a través del litoral atlántico norteamericano se debe a la transmisión de un clon de células neoplásicas de almejas enfermas a almejas sanas, es un acicate para evaluar si es este el mecanismo de transmisión de la neoplasia diseminada en berberechos y en otras especies de bivalvos afectadas. De hecho, los resultados de este estudio, con la transmisión de la enfermedad mediante la inoculación de células neoplásicas intactas en berberechos sanos mientras que no se transmitió cuando las células habían sido filtradas y lisadas, son más coherentes con la hipótesis de que son las propias células neoplásicas las que se transmiten entre berberechos expandiendo la enfermedad.

Por otro lado, como se menciona en la introducción general de esta memoria, hay abundantes referencias bibliográficas que defienden una asociación de la neoplasia diseminada de moluscos bivalvos con contaminación. En este estudio no se detectó asociación de la neoplasia diseminada del berberecho con contaminación por metales pesados. La transmisibilidad confirmada de la neoplasia diseminada entre berberechos, en definitiva, su dinámica infecciosa, permite explicar que la prevalencia en bancos del litoral gallego sea alta, sin necesidad de una implicación de cualquier tipo de contaminación.

El estudio realizado durante 7 años de la dinámica de la enfermedad en dos bancos ha demostrado que se trata de una enfermedad hiperendémica en dichos bancos, con un patrón de variación estacional que supone la presencia de individuos enfermos durante todo el año. El aumento de la severidad de la enfermedad hasta provocar la muerte en un porcentaje significativo de los berberechos adultos de estos bancos en primavera, coincidiendo con el estrés de la gametogénesis y la puesta, que explicaría la caída de prevalencia en ese periodo del año. En estudios previos se había hipotetizado sobre el efecto de la gametogénesis y puesta sobre la prevalencia de neoplasia. En este estudio se ha evidenciado la coincidencia temporal entre la prevalencia mínima anual frente a los máximos valores de índice gonadal, demostrando una clara asociación entre neoplasia diseminada y reproducción. Se han encontrado evidencias de que esta enfermedad puede ser letal y provoca una mortalidad significativa en los dos bancos estudiados e, incluso, un efecto subletal es la inhibición de la gametogénesis, de manera que a nivel poblacional, la enfermedad no sólo provoca mortalidad sino que, afectando la fecundidad del berberecho, puede afectar al reclutamiento.

Evolución de la neoplasia diseminada en berberechos

A lo largo de este estudio se ha analizado la variación de parámetros y la evolución de procesos al progresar la neoplasia diseminada en el berberecho. En los párrafos siguientes se resume de forma integrada estas variaciones en las etapas sucesivas de la neoplasia diseminada.

En **etapas iniciales** de la neoplasia diseminada (N1) el porcentaje de células neoplásicas en la hemolinfa no supera el 15%, observándose células aisladas en tejido cojuntivo de branquia, manto, gónada o glándula digestiva. Se detectan un 4.5% células aneuploides, con una ploidía entre 1.6n y 4.7n. En esta etapa temprana de la enfermedad se detectan cambios bruscos en el ion calcio intracelular y en actina en las células neoplásicas con respecto a los hemocitos normales. El aumento del ion calcio intracelular y la disminución de la concentración de actina se van a conservar en etapas avanzadas de la neoplasia diseminada y podrían ser candidatos a su uso como marcadores de células neoplásicas. Por otra parte, los ligeros aumentos de actividad lisosómica y esterasas detectados en las células neoplásicas en comparación con los hemocitos podrían estar relacionados con el aumento de la tasa metabólica. En esta etapa no se detectan diferencias significativas en el porcentaje de células en apoptosis con respecto a individuos sanos. Sin embargo el número de células neoplásicas apoptóticas en esta fase es significativamente mayor que en las etapas siguientes de la enfermedad. En esta etapa todavía no se detecta proteína p53 mutada y los niveles de Hsp70 son más bajos que en fases más avanzadas de la enfermedad; cabría pensar en la posibilidad de remisión de la enfermedad en esta etapa temprana.

En las etapas de **intensidad media**, en que el porcentaje de células neoplásicas en la hemolinfa está entre el 15-75%, **y alta**, en las que el porcentaje supera el 75%, las células neoplásicas forman focos y se diseminan por todos los órganos llegando a remplazar a las células normales y causando daños estructurales. La ploidía aumenta (de 1.3n a 5.3n en N2 y de 1.6n a 8.9n en N3) así como el porcentaje de cromosomas doble diminuto, el nivel de actividad esterasas no específicas y la actividad lisosómica en las células neoplásicas. En la etapa de intensidad media (N2) se comienza a detectar la expresión de p53 mutada y aumenta la expresión de las proteínas de choque térmico, siendo más acusado el aumento de la concentración de estas proteínas cuando la intensidad es alta (N3). También se detecta un descenso del porcentaje de células en apoptosis en berberechos con intensidad de neoplasia alta. El aumento de la concentración de especies intermediarias reactivas de oxígeno únicamente se detecta en las etapas más avanzadas de la enfermedad, lo que podría deberse a una tasa metabólica de las células neoplásicas mayor que la de que los hemocitos más que a su transformación oncogénica (Schumacker et al, 2006). Cuando la formación de especies reactivas de oxígeno supera la capacidad antioxidante celular podría causar mutaciones y daños en el ADN (Nogueira y Hay, 2013). Este incremento de ROIs (si se liberan) podría contribuir al aumento detectado de la mortalidad de hemocitos en esta etapa de la enfermedad.

Tabla 4: (en páginas siguientes) Resumen de la variación de parámetros y procesos estudiados con la progresión de la neoplasia diseminada en berberecho Cerastoderma edule. Los recuadros azules agrupan resultados similares.

	N0	N1	N2	N3
Muestra de hemolinfa	Ausencia de células neoplásicas	Entre 0 y 15% de las células son neoplásicas	Entre 15 y 75% de las células son neoplásicas	Más del 75% de las células son neoplásicas
Corte histológico	Ausencia de células neoplásicas en tejidos	Aparecen células aisladas en tejido conjuntivo de manto, gónada y digestivo	Formación de pequeños focos de células neoplásicas en tejido conjuntivo de manto, gónada y glándula digestiva. Migración de células neoplásicas a otros órganos.	Las células neoplásicas están infiltradas en el conjuntivo de todos los órganos, en alta densidad, alterando la arquitectura de tejidos y órganos.
Actividad transcriptasa inversa	No se detecta en berberechos de bancos libres enfermedad. Se detecta actividad transcriptasa inversa ligera en algunos berberechos sanos de bancos afectados	Se detecta actividad transcriptasa inversa en todos los casos	Se detecta actividad transcriptasa inversa en todos los casos	Se detecta actividad transcriptasa inversa pero no en todos los casos
Ploidía	2n	1.6n-4.7n	1.3n-5.3n	1.6n-8.9n
Número de cromosomas	2n=38 cromosomas	-----	Hasta 317 cromosomas. 40% de cromosomas doble diminuto	Hasta 230 cromosomas. 45% de cromosomas doble diminuto
Apoptosis	Porcentaje de apoptosis de referencia en cortes histológicos y en muestras de hemolinfa.	Reducción moderada del porcentaje de apoptosis en cortes histológicos y en muestras de hemolinfa. Se detecta apoptosis en células neoplásicas.	Reducción moderada del porcentaje de apoptosis en cortes histológicos y en muestras de hemolinfa. Disminuye el porcentaje de apoptosis en células neoplásicas.	Reducción intensa del porcentaje de apoptosis en cortes histológicos y moderada en muestras de hemolinfa. Disminuye el porcentaje de apoptosis en células neoplásicas.

	N0	N1	N2-N3	
Necrosis	Mortalidad baja de hemocitos.	Mortalidad baja de hemocitos.	Aumenta significativamente la mortalidad de hemocitos.	
Esterasas no específicas	Porcentaje bajo de células con alto contenido de esterases no específicas.	Porcentaje medio de células con alto contenido de esterases no específicas.	Porcentaje alto de células con alto contenido de esterases no específicas.	
Actividad lisosómica	Porcentaje bajo de células con alto contenido de actividad lisosómica.	Porcentaje medio de células con alto contenido de actividad lisosómica.	Porcentaje alto de células con alto contenido de actividad lisosómica.	
Intermediarios de oxígeno	Porcentaje bajo de células con alta producción de ROS.	Porcentaje bajo de células con alta producción de ROS.	Porcentaje alto de células con alta producción de ROS.	
Actividad fagocítica	Los hemocitos tienen capacidad fagocítica.	Los hemocitos mantienen su capacidad fagocítica.	Los hemocitos mantienen su capacidad fagocítica. Las células neoplásicas no tienen capacidad fagocítica.	
Ion calcio intracelular	Porcentaje bajo de células con alto contenido de ion calcio libre intracelular.	Porcentaje alto de células con alto contenido de ion calcio libre intracelular.	Porcentaje alto de células con alto contenido de ion calcio libre intracelular.	
Actina	Porcentaje alto de células con alto contenido de actina.	Porcentaje bajo de células con alto contenido de actina.	Porcentaje bajo de células con alto contenido de actina.	
p53 mutado	No se detecta proteína p53 mutada.	No se detecta proteína p53 mutada.	Detección de proteína p53 mutada.	Detección de proteína p53 mutada.
Hsps	Detección baja de Hsp70-Hsp90.	Detección media de Hsp70-Hsp90.	Detección alta de Hsp70-Hsp90.	Detección muy alta de Hsp70-Hsp90.



9. CONCLUSIONES



9. CONCLUSIONES

- La neoplasia diseminada está asociada a alteraciones de la ploidía celular. Las células neoplásicas contienen mayor número de cromosomas que las células normales, pierden cromosomas homólogos y muestran numerosos cromosomas de tipo doble diminuto.
- La progresión de la neoplasia diseminada está asociada con la disminución de la frecuencia de células apoptóticas en el berberecho.
- La neoplasia diseminada está asociada a la mutación del gen p53, detectándose proteína p53 alterada (mutada) en el citoplasma de células de hemolinfa de berberechos con nivel moderado e intenso de neoplasia diseminada. La expresión de Hsp70 y Hsp90 en el citoplasma de células de hemolinfa de berberechos aumenta con la progresión de la enfermedad.
- Las células neoplásicas presentes en la hemolinfa de berberechos afectados por neoplasia diseminada son de gran tamaño, redondeadas, sin pseudópodos, con un núcleo pleomórfico de gran tamaño que frecuentemente presenta uno o más nucleolos. Su citoplasma contiene mitocondrias numerosas, que con frecuencia se reúnen en áreas concretas, así como abundantes vesículas claras a los electrones, túbulos de retículo endoplásmico y aparato de Golgi.
- La mortalidad de los hemocitos aumenta al intensificarse la enfermedad. Las células neoplásicas muestran mayor actividad esterasa no específica, mayor biovolumen correspondiente a lisosomas, mayor producción de intermediarios reactivos de oxígeno y mayor concentración de ion calcio en el citoplasma que los hemocitos. En cambio, la capacidad fagocítica y el contenido de actina de las células neoplásicas es menor que en el caso de los hemocitos.
- Etiología: la neoplasia diseminada es una enfermedad transmisible; se contagia de berberechos enfermos a berberechos sanos. La neoplasia diseminada está asociada a la detección de transcriptasa inversa en los tejidos de berberechos afectados; esto no es concluyente para establecer que un retrovirus es el agente etiológico de la neoplasia diseminada del berberecho. No se detectó asociación de la neoplasia diseminada con contaminación por metales pesados.

- La neoplasia diseminada es una enfermedad hiperendémica en algunas áreas del litoral gallego, donde está presente todo el año. La prevalencia es mínima en primavera debido a la muerte de los individuos afectados de forma severa, lo que coincide con la madurez gonadal y el inicio de la puesta.
- La neoplasia diseminada tiene efecto inhibitorio sobre la gametogénesis del berberecho pero el sexo de los berberechos no influye en la susceptibilidad a la enfermedad.





10. BIBLIOGRAFÍA



10. BIBLIOGRAFÍA

- AboElkhair, M., et al., 2009a. Reverse transcriptase activity associated with haemic neoplasia in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 84, 57–63.
- AboElkhair, M., et al., 2009b. Reverse transcriptase activity in tissues of the soft shell clam *Mya arenaria* affected with haemic neoplasia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 102, 133–140.
- AboElkhair, M., et al., 2012. Lack of detection of a putative retrovirus associated with haemic neoplasia in the soft shell clam *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 109, 97-104.
- Alderman, D.J., Van Banning, P., Pérez-Colomer, A., 1977. Two European oyster (*Ostrea edulis*) mortalities associated with abnormal haemocytic condition. *Aquaculture*. 10, 335-340.
- Alonso, A., et al., 2001. Structural study of a possible neoplasia detected in *Mytilus galloprovincialis* collected from the Ría of Vigo (NW Spain). *Disease of Aquatic Organism*. 47, 73-79.
- André, M., et al., 2000. Quantitative Detection of RT Activity by PERT Assay: Feasibility and Limits to a Standardized Screening Assay for Human Vaccines. *Biologicals*. 28, 67-80.
- Ansell, A.D., 1981. Upper temperature tolerances of some European molluscs. III. *Cardium glaucum*, *C. tuberculatum* and *C. edule*. *Marine Biology*. 65, 177-183.
- Appeldoorn, R., et al., 1984. Field and laboratory studies to define the occurrence of neoplasia in the soft shell clam, *Mya arenaria*. American Petroleum Institute (Ed.), Washington, D.C., pp. 201.
- Arnold, W., et al., 2004. Influence of congeneric aquaculture on hard clam (*Mercenaria* spp.) population genetic structure. *Aquaculture*. 12, 139-160.
- Arriagada, G., et al., 2014. Activation of transcription and retrotransposition of a novel element Steamer in neoplastic hemocytes of the mollusk *Mya arenaria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 111, 14175-14180.
- Atkins, D., 1934. Two parasites of the common cockle *Cardium edule*: a rhabdocoele *Paravortex cardii* Hallez and copepod *Paranthesius rostratus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kindom*. 19, 669-676.
- Aton, E., et al., 2006. A flow cytometric approach to study intracellular-free Ca²⁺ in *Crassostrea gigas* haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. 20, 493-502.
- Auffret, M., Poder, M., 1986. Sarcomatous lesion in the cockle *Cerastoderma edule*. II. Electron microscopical study. *Aquaculture*. 58, 9-15.
- Azevedo, C., 1993. Occurrence of an unusual branchial mycoplasma-like infection in cockle *Cerastoderma edule* (Mollusc, Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms*. 16, 55-59.
- Azevedo, C., Cachola, R., 1992. Fine structure of the apicomplexan oocyst of *Nematopsis* sp. of two marine bivalve molluscs. *Disease of Aquatic Organisms*. 14, 69-73.
- Azevedo, C., Canning, E.U., 1987. Ultrastructure of a microsporidian hyperparasite, *Unikaryon legeri* (*Microsporidia*), of trematode larvae. *Journal of Parasitology*. 73, 214-223.
- Azevedo, C., et al., 2003. Description of *Haplosporidium edule* n. sp. (Phylum *Haplosporidia*), a parasite of *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia) with complex spore ornamentation. *European Journal of Protistology*. 39, 161-167.
- Babarro, J.M.F., de Zwaan, A., 2001. Factors involved in the (near) anoxic survival time of *Cerastoderma edule*: associated bacteria vs. endogenous fuel. *Comparative Biochemistry and Physiology-C: Toxicology and Pharmacology*. 128, 325-337.
- Babarro, J.M.F., de Zwaan, A., 2008. Anaerobic survival potencial of four bivalves from different habitats. A comparative survey. *Comparative Biochemistry and Physiology-C: Toxicology and Pharmacology*. 151, 108-113.
- Bachère, E., et al., 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Developmental and Comparative Immunology*. 12, 549-559.
- Ballarin, L., et al., 1977. Calcium homeostasis and yeast phagocytosis in hemocytes of the colonial ascidian *Botryllus shlosseri*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 118, 153-158.
- Balouet, G., et al., 1986. Proliferative hemocytic condition in European flat oysters (*Ostrea edulis*) from Breton Coasts: A 6-Year Survey. *Journal of Invertebrate Pathology*. 48, 208-215.
- Balouet, G., Poder, M., 1985. Current status of parasitic and neoplastic disease of shellfish: a review. En: *Fish and shellfish pathology*. Ellis A.W. (Ed.), Academic Press, London, pp. 371-380.
- Barber, B.J., 1990. Seasonal prevalence and intensity and disease progression of neoplasia in soft shell clams, *Mya arenaria*, from the Shrewsbury River, New Jersey. *Pathology in Marine Science*. 377-386.

- Barber, B.J., 1990. Seasonal prevalence and intensity and disease progression of neoplasia in soft-shell clams, *Mya arenaria*, from The Shrewsbury River, New Jersey. En: Pathology in Marine Science. F. O. a. C. T. C. Perkins (Ed.), Academic Press, Gloucester Point, pp. 377-386.
- Barber, B.J., 1996. Effects of Gonadal Neoplasms on Oogenesis in Softshell Clams, *Mya arenaria*. Journal of Invertebrate Pathology. 67, 161-168.
- Barber, B.J., 2004. Neoplastic diseases of commercially important marine bivalves. Aquatic Living Resources. 17, 449-466.
- Barber, B.J., Davis, C.V., 1994. Disease studies in Maine-1993. Journal of Shellfish Research. 13, 311-313.
- Barber, B.J., et al., 2002. Occurrence and lack of transmissibility of gonadal neoplasia in softshell clams, *Mya arenaria*, in Maine (USA) and Atlantic Canada. Aquatic Living Resources. 15, 319-326.
- Barker, C.M., et al., 1997. Detection of mutant p53 in clam leukemia cells. Experimental Cell Research. 232, 240-245.
- Barry, M.M., Yevich, P. P., 1972. Incidence of gonadal cancer in the quahog *Mercenaria mercenaria*. Oncogenesis. 26, 87-96.
- Bartoli, P., 1965. Développement expérimental d'une métacercarie nouvelle de la famille des *Gymnophallidae* Morozov, 1955 (*Trematoda: Digenea*), parasite de lamellibranches marins. Bulletin de la Société zoologique de France. 90, 571-580.
- Bartoli, P., Gibson, D.I., 2007. Synopsis of the life cycles of *Digenea (Platyhelminthes)* from lagoons of the northern coast of the western Mediterranean. Journal of Natural History. 41, 1553-1570.
- Batista, I., et al., 2012. Inland aquaculture of *Cerastoderma edule*-fate and importance of dietary fatty acid. Journal of Shellfish Research. 31, 261.
- Beckmann, N., et al., 1992. Comparative study of phagocytosis in normal and diseased hemocytes of the bivalve mollusc *Mya arenaria*. Journal of Invertebrate Pathology. 59, 124-132.
- Beere, H.M., et al., 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. Nature Cellular Biology. 2, 469-475.
- Beiras, R., et al., 2003. Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryolaval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. Marine Environmental Research. 56, 531-553.
- Bert, T.M., et al., 1993. High frequency of gonadal neoplasia in a hard clam (*Mercenaria* spp.) hybrid zone. Marine Biology. 117, 97-104.
- Bignell, J.P., et al., 2008. Mussel histopathology: effects of season, disease and species. Aquatic Biology. 2, 1-15.
- Blanchet, H., et al., 2003. Effects of digenian trematodes and heterotrophic bacteria on mortality and burying capability of the common cockle *Cerastoderma edule* (L.). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 293, 89-105.
- Böttger, S.A., et al., 2008. Genotoxic Stress-Induced expression of p53 and apoptosis in leukemic clam hemocytes with cytoplasmically sequestered p53. Cancer Research. 68, 777-782.
- Böttger, S.A., et al., 2013. Chronic natural occurrence of disseminated neoplasia in select populations of the soft-shell clam, *Mya arenaria*, in New England. Northeastern Naturalist. 20, 430-440.
- Boutet, I., et al., 2003a. Expression of Hsp70 in experimentally metal-exposed European flat oysters *Ostrea edulis*. Journal of Shellfish Research. 22, 763-766.
- Boutet, I., et al., 2003b. Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (hsc70) and heat shock protein 70 (hsp70) gene in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Cell stress and chaperones. Cell Stress Chaperones. 8, 76-85.
- Bower, S., et al., 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. Annual Review of Fish Diseases. 4, 1-199.
- Bower, S.M., 1989. The summer mortality syndrome and haemocytic neoplasia in blue mussels (*Mytilus edulis*) from British Columbia. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences. N°1703. pp. 231.
- Bowers, E.A., James, B.L., 1967. Studies on the morphology, ecology and life-cycle of *Meiogymnophallus minutus* (Cobbold, 1859) comb. Nov. (Trematoda: Gymnophallidae). Parasitology. 57, 281-300.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Analytical Biochemistry. 72, 248-254.
- Brooks, K.M., Elston, R.A. 1991. Epizootiology of hemic neoplasia in *Mytilus trossulus* within Washington State. II. Journal of Shellfish Research. 10, 233.

- Brousseau, D.J., 1987. Seasonal aspects of sarcomatous neoplasia in *Mya arenaria* (Soft-Shell Clam) from Long Island Sound. *Journal of Invertebrate Pathology*. 50, 269-276.
- Brousseau, D.J., Baglivo J.A., 1991a. Disease progression and mortality in neoplastic *Mya arenaria* in the field. *Marine Biology*. 110, 249-252.
- Brousseau, D.J., Baglivo J.A., 1991b. Field and laboratory comparisons of mortality in normal and neoplastic *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 57, 59-65.
- Brousseau, D.J., Baglivo J.A., 1994. Notes on epizootiological aspects (sex and age) of disseminated neoplasia in *Mya arenaria* from Long Island Sound. *Journal of Invertebrate Pathology*. 63, 214-216.
- Brown, R.S., 1980. The value of the multidisciplinary approach to research on marine pollution effects as evidenced in a three - year study to determine the etiology and pathogenesis of neoplasia in the soft - shell clam, *Mya arenaria*. *Rapports et Proces-verbaux des Réunions. Conseil International pour l'Exploration de la Mer*. 179, 125-128.
- Brown, R.S., et al., 1976. A preliminary report on neoplasia in feral populations of the soft-shell clam, *Mya arenaria*, prevalence, histopathology and diagnosis. En: *Proceedings of the First International Colloquium on Invertebrate Pathology*, Kingston, Ontario, Canada, pp. 356-361.
- Brown, R.S., et al., 1977. Prevalence of neoplasia in 10 New England populations of the soft-shell clam (*Mya arenaria*). *Annals New York Academy of Sciences*. 298, 522-534.
- Brown, R.S., et al., 1979. Hydrocarbon pollution and the prevalence of neoplasia in New England soft-shell clams (*Mya arenaria*). En: *Animals as Monitors of Environmental Pollutants*. National Research Council, National Academic Press, Washington, D.C. pp. 41-51.
- Brusa, F., et al., 2006. A new Paravortex (*Platyhelminthes, Dalyellioida*) endoparasite of *Mesodesma mactroides* (Bivalvia, Mesodesmatidae) from Uruguay. *Parasitology Research*. 99, 566-571.
- Butler, R.A., et al., 2004. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-independent effects of 2,3,7,8-tatrehlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on softshell clam (*Mya arenaria*) reproductive tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 138, 375-381.
- Cameron, A., 2002. Survey toolbox for aquatic animal diseases. A practical manual and software package. Australian Centre for International Agricultural Research Monograph. 94, 1-375.
- Campalans, M., et al., 1998. Neoplasia in *Mytilus chilensis* cultivated in Chiloe Island (Chile). *Bulletin European Association of Fish Pathologists*. 18, 93-95.
- Canu, E., 1982 Les copepods du Boulonnais. Morphologie, embryologie, taxonomie. *Trav. Lab. Zool. Marit. Wimereux*. 6, 1-354.
- Cao, A., et al., 2004. Implication of PKA and PKC in the activation of the haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. by LPS and IL-2. *Molecular Immunology*. 41, 45-52.
- Carballal, M.J., et al., (en prensa). Neoplastic diseases of marine bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*.
- Carballal, M.J., et al., 1997. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 29, 127-135.
- Carballal, M.J., et al., 2001. Parasites and pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the coast of Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*. 78, 87-97.
- Carballal, M.J., et al., 2003. Virus-like particles associated with large foci of heavy hemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*. 84, 234-237.
- Carballal, M.J., et al., 2005. Urosporidium sp. hyperparasite of the turbellarian Paravortex *cardii* in the cockle *Cerastoderma edule*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 90, 104-107.
- Carballal, M.J., et al., 2013. Disseminated neoplasia in clams *Venerupis aurea* from Galicia (NW Spain): Histopathology, ultrastructure and ploidy of the neoplastic cells, and comparison of diagnostic procedures. *Journal of Invertebrate Pathology*. 112, 16-19.
- Carrasco, N., et al., 2011. A *Marteilia* parasite and digestive epithelial virosis lesions observed during a common edible cockle *Cerastoderma edule* mortality event in the Spanish Mediterranean coast. *Aquaculture*. 321, 197-202.
- Carrasco, N., et al., 2012. Molecular characterization of the *Marteilia* parasite infecting the common edible cockle *Cerastoderma edule* in the Spanish Mediterranean coast: A new *Marteilia* species affecting bivalves in Europe? *Aquaculture*. 324-325, 20-26.
- Carrasco, N., et al., 2013. *Marteilia cochillia* sp. nov., a new *Marteilia* species affecting the edible cockle *Cerastoderma edule* in European Waters. *Aquaculture*. 412-413, 223-230.

- Carrasco, N., et al., 2014. *Perkinsus chesapeaki* observed in a new host, the European common edible cockle *Cerastoderma edule* in the Spanish Mediterranean coast. *Journal of Invertebrate Pathology*. 117(1), 56-60.
- Chai, J.Y., et al., 2007. A new gymnophallid trematode from the intestine of mice infected with metacercariae from the razor clam *Sinonovacula constricta*. *Journal of Parasitology*. 93, 132-137.
- Chatton, E., Lwoff, A. 1922. Sur l'évolution des infusoires des lamellibranches. Relation des sphenophryides avec les hypocomides *Comptes Rendus de l'Academia Science Paris*. 175, 1444-1447.
- Chatton, E., Lwoff, A. 1950. Recherches sur les cilies thigmotriches. II. *Arch. Zool. Exp. Gen.* 86, 393-485.
- Cheng, T., 1981. Bivalves. En: *Invertebrate bloods cells*. R. A. Ratcliffe NA, (Ed.), Academic Press, London, pp. 233-300.
- Cheng, T.C., 1996. Hemocytes: forms and functions. En: *The Eastern Oyster, Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant Book. Kennedy, V.S., Newell, R.I.E., Eble, A.F. (Ed.), College Park, MD, USA, pp. 299-333.
- Christensen, D.J., et al., 1974. Epizootic neoplasms in the clam, *Macoma balthica* (L) from the Chesapeake Bay. *Journal of the National Cancer Institute*. 52, 1739-1749.
- Chu, F.L.E., 2000. Defense mechanisms of marine bivalves. En: *Recent Advances in Marine Biotechnology: Immunobiology and Pathology*. Fingerma, N., Nagabhushanam, R. (Eds.), Science Publishers, Enfield, NH, USA, pp. 1-42.
- Ciocan, C., Sunila, I., 2005. Disseminated neoplasia in blue mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from the Black Sea, Romania. *Marine Pollution Bulletin*. 50, 1335-1339.
- Ciocan, C.M., et al., 2006. The role of *ras* gene in the development of haemic neoplasia in *Mytilus trossulus*. *Marine Environmental Research*. 62, S147-S150.
- Ciocan, C.M., Rotchell, J. M., 2005. Conservation of cancer genes in the marine invertebrate *Mytilus edulis*. *Environmental Science & Technology*. 39, 3029-3033.
- Ciocca, D.R., Calderwood, S.K., 2005. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 10, 86-103.
- Coffin, J., et al., 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Ed.), Cold Spring Harbor, New York.
- Cohen, J.J., et al., 1992. Apoptosis and Programmed Cell Death in Immunity. *Annual Review of Immunology*. 10, 267-293.
- Collins, C.M., 1998. Studies on a Neoplasm of the Cockle, *Cerastoderma edule* (Linnaeus). Tesis doctoral. National University of Ireland, Cork.
- Collins, C.M., Mulcahy, M.F., 2003. Cell-free transmission of a haemic neoplasm in the cockle *Cerastoderma edule*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 54, 61-67.
- Comps, M., et al., 1975. Pathologie des invertébrés Parasites nouveaux de la glande digestive des mollusques marins *Mytilus edulis* (L.) et *Cardium edule* (L.). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 281, 179-181.
- Comtet, T., et al., 2003. Infection of the cockle *Cerastoderma edule* in the Baie des Veys (France) by the microsporidian parasite *Steinhausia* sp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 57, 135-139.
- Conover, W.J., 1999. *Practical nonparametric statistics*. John Wiley & Sons (Ed.), New York.
- Cooper, K.R., et al., 1982a. Accuary of blood cytological screening techniques for the diagnosis of a possible hematopoietic neoplasm in the bivalve mollusc, *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 39, 281-289.
- Cooper, K.R., et al., 1982b. The course and mortality of a hematopoietic neoplasm in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 39, 149-157.
- Cosson-Mannevy, M.A., et al., 1984. Putative neoplastic disorders in mussels (*Mytilus edulis*) from southern Vancouver Island waters, British Columbia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 44, 151-160.
- Couch, J.A, 1985. Prospective study of infectious and non-infectious diseases in oysters and fishes in three Gulf of Mexico estuaries. *Diseases of Aquatic Organisms*. 1, 59-82.
- Couch, J.A., 1969. An unusual lesion in the mantle of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*. 31557-31562.
- Couch, J.A., Winstead, J.T., 1979. Concurrent neoplastic and protistan disorders in the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Haliotis*. 8, 249-253.
- Cox, R.L., et al., 2003. p63/73 homologues in surf clam: novel signaling motifs and implications for control of expression. *Gene*. 320, 49-58.

- Cremonte, F., et al., 2011. Gonad atrophy caused by disseminated neoplasia in *Mytilus chilensis* cultured in the Beagle Channel, Tierra del Fuego province, Argentine. *Journal of Shellfish Research*. 30, 845-849.
- Culurgioni, J., et al., 2006. Parasitological monitoring of commercial native bivalves from St. Gilla lagoon (Sardinia, South Western Mediterranean). *Ittiopatologia*. 3, 243-252.
- Da Ros L, Canzonier WJ (1985) *Perkinsus*, a protistan threat to bivalve culture in the Mediterranean basin. *Bulletin European Association of Fish Pathology*. 5(2), 23–27.
- da Silva, P.M., et al., 2005. Flow cytometric DNA content analysis of neoplastic cells in haemolymph of the cockle *Cerastoderma edule*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 67, 133-139.
- da Silva, P.M., et al., 2011. Disseminated neoplasia in flat oysters *Ostrea edulis* from Galicia (NW Spain): Occurrence, ultrastructural aspects and relationship with bonamiosis. *Journal of Invertebrate Pathology*. 107, 50-59.
- Dang, C., et al., 2013. Parasites of QX-resistant and wild-type Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*) in Moreton Bay, SE Queensland, Australia: Diversity and host response. *Journal of Invertebrate Pathology*. 112, 273-277.
- Darriba, S., et al., 2006. Germinoma in razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) in Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*. 93, 140-142.
- Darriba, S., et al., 2010. Detection of *Perkinsus olseni* infecting the cockle *Cerastoderma edule* in Galicia (NW Spain). *Aquaculture Europe (2010 OPorto)*. *Aquaculture Europe 10: Sea Farming Tomorrow*. European Aquaculture Society. 170, 356-357.
- de Montaudouin, X., et al., 2000. A census of macroparasites in an intertidal bivalve community, Arcachon Bay, France. *Oceanologica Acta*. 23, 453-468.
- de Montaudouin, X., et al., 2009. Digenean trematode species in the cockle *Cerastoderma edule*: identification key and distribution along the north-eastern Atlantic shoreline. *Journal Marine Biology*. 89, 543-556.
- De Vera, A.Z., et al., 2005. Occurrence of hemic neoplasia in slipper oyster, *Crassostrea iredalei* (Faustino, 1928), in Dagupan city, Philippines. En: *Diseases in Asian Aquaculture*. V. Fish Health Section, Walker, P., Lester R., Bondad-Reantaso, M.G., (Ed.), Asian Fisheries Society, Manila. pp. 321-325.
- de Zwaan, A., et al., 2002. Anoxic survival potential of bivalves: artefacts. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*. 131, 615-624.
- Debatin, K.M., 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 53, 153-159.
- Delaporte, M., et al., 2008a. Assessment of haemic neoplasia in different soft shell clam *Mya arenaria* populations from eastern Canada by flow cytometry. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98, 190-197.
- Delaporte, M., et al., 2008b. Immunophenotyping of *Mya arenaria* neoplastic hemocytes using propidium iodide and specific monoclonal antibody by flow cytometry. *Journal of Invertebrate Pathology*. 99, 120-122.
- Desclaux, D., et al., 2002. Cockle emergence at the sediment surface: 'favourization' mechanism by digenean parasites? *Diseases of Aquatic Organisms*. 52, 137-149.
- Desclaux, D., et al., 2004. Cockle *Cerastoderma edule* population mortality: role of the digenean parasite *Himasthla quissetensis*. *Marine Ecology Progress Series*. 279, 141-150.
- Díaz, S., et al., (En revisión). Long term epidemiological study of disseminated neoplasia of cockles in Galicia (NW Spain): temporal patterns at individual and population levels, influence of environmental and cockle-based factors, and lethality. *Journal of Fish Diseases*.
- Díaz, S., et al., 2010. Expression of mutant protein p53 and Hsp70 and Hsp90 chaperones in cockles *Cerastoderma edule* affected by neoplasia. *Diseases of Aquatic Organisms*. 90, 219-226.
- Díaz, S., et al., 2011. Disseminated neoplasia in cockles *Cerastoderma edule* ultrastructural characterisation and effects on haemolymph cell parameters. *Diseases of Aquatic Organisms*. 96, 157-167.
- Díaz, S., et al., 2011a. Presencia y efectos patológicos del copépodo (*Herrmannella rostrata* Canu, 1891) en berberechos (*Cerastoderma edule* Linnaeus, 1758) de Galicia (NO España). En: *IV Foro Iberoamericano de Recursos Marinos en Acuicultura*. 435-444.
- Díaz, S., et al., 2013. Disseminated neoplasia caused changes in ploidy and apoptosis frequency in cockles *Cerastoderma edule*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 113, 214-219.

- Dobbelstein, M., Roth, J., 1998. The large T antigen of simian virus 40 binds and inactivates p53 but not p73. *Journal of General Virology* 79, 3079–3083.
- Donaghy, L., et al., 2010. First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus*. *Fish Shellfish Immunology*. 28, 87-97.
- Donner, B.J., 1968. Minute chromatin bodies in two mouse tumours induced in vivo by Rous sarcoma virus. *Folia Biol (Praha)*. 14, 86-88.
- Dopp, E., et al., 1996. Detection of micronuclei in hemocytes of *Mya arenaria*: association with leukemia and induction with an alkylating agent. *Aquatic Toxicology*. 34, 31-45.
- Duesberg, P., et al., 2005. The chromosomal basis of cancer. *Cellular Oncology*. 27, 293-318.
- Dungan, C.F., et al., 2002. Two epizootic diseases in Chesapeake Bay commercial clams, *Mya arenaria* and *Tagelus plebeius*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 50, 67-78.
- Dungan, C.F., et al., 2005. First report of disseminated neoplasia prevalent in Chesapeake Bay commercial razor clams, *Tagelus plebeius*. *Journal of Shellfish Research*. 24, 652-652.
- Ekstrand, D.H., et al., 1996. A sensitive assay for the quantification of reverse transcriptase activity based on the use of carrier-bound template and non-radioactive-product detection, with special reference to human-immunodeficiency-virus isolation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 23, 95-105.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 35, 495-516.
- Elsayed, E.E., et al., 1999. Protease inhibitors in plasma of the softshell clam *Mya arenaria*: identification and effects of disseminated sarcoma. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 123B, 427-435.
- Elston, R.A., et al., 1988. Transmission of hemic neoplasia in the bay mussel, *Mytilus edulis*, using whole cells and cell homogenate. *Developmental and Comparative Immunology*. 12, 719-727.
- Elston, R.A., et al., 1990. Progressive development of circulating polyploid cells in *Mytilus* with hemic neoplasia. *Diseases of Aquatic Organisms*. 8, 51-59.
- Elston, R.A., et al., 1992. Disseminated neoplasia of bivalve molluscs. *Aquatic Sciences*. 6, 405-466.
- Emmett, B., 1984. The analysis of summer mortality in cultured mussels, *Mytilus edulis*, final report. British Columbia Science Council Grant. 58 (RC-7), pp. 74.
- Eversole, A.G., Heffernan, P.B., 1995. Gonadal neoplasia in Northern *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758) and southern *M. campechiensis* (Gmelin, 1791) quahogs and their hybrids cultured in South Carolina. *Journal of Shellfish Research*. 14, 33-39.
- Farcy, E., et al., 2008. Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression level. *Marine Environmental Research*. 66, 300-308.
- Farley, C.A., 1969a. Probable neoplastic disease of the hematopoietic system in oysters, *Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*. 31, 541-555.
- Farley, C.A., 1969b. Sarcomatoid proliferative disease in a wild population of blue mussel (*Mytilus edulis*). *Journal of the National Cancer Institute*. 43, 509-516.
- Farley, C.A., 1976. Proliferative disorders in bivalve mollusc. *Marine Fisheries Review*. 38, 30-33.
- Farley, C.A., 1978. Viruses and viruslike lesions in marine mollusks. *Marine Fisheries Review*. 40, 18-20.
- Farley, C.A., 1988. Selected aspects of neoplastic progression in mollusks. En: *Fundamental aspects of neoplastic progression*. H. Kaiser, (Ed.), New York, 1988, pp. 24-31.
- Farley, C.A., et al., 1986. New occurrence of epizootic sarcoma in Chesapeake Bay soft shell clams, *Mya arenaria*. *Fishery Bulletin*. 84 (4), 851-857.
- Farley, C.A., et al., 1991. Epizootiology and distribution of transmissible sarcoma Maryland soft shell clams, *Mya arenaria*, 1984-1988. *Environmental Health Perspectives*. 90, 35-41.
- Farley, C.A., Sparks, A. K., 1969. Proliferative diseases of hemocytes, endothelial cells, and connective tissue cells in mollusks. *Comparative Leukemia Research*. 36, 610-617.
- Fenchel, T., 1965. Ciliates from Scandinavian Molluscs. *Ophelia*. 2, 171-174.
- Figueras, A.J., 1991. Bonamia status and its effects in cultured flat oysters in the Ría de Vigo, Galicia (NW Spain). *Aquaculture*. 93, 225-233.
- Figueras, A.J., et al., 1991. Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): preliminary results. *Aquaculture*. 99, 17-33.
- Figus, V., et al., 2006. Parassiti di *Cerastoderma glaucum* (Poiret, 1879) della laguna di Sta. Gilla, Sardegna meridionale. *Ittiopatologia*. 3, 69-74.
- Fisher, W.S., Ford, S. E., 1988. Flow Cytometry: A Tool for Cell Research in Bivalve Pathology. *American Fisheries Society*. 18, 286-291.

- Ford, S.E., et al., 1997. Disseminated neoplasia in juvenile eastern oysters, *Crassostrea virginica*, and its relationship to the reproductive cycle. *Diseases of Aquatic Organisms*. 28, 73-77.
- Friedman, C.S., et al., 2005. Pilot study in the Olympia oyster *Ostrea cochaphila* in the San Francisco Bay estuary: description and distribution of diseases. *Diseases of Aquatic Organisms*. 65(1), 1-8.
- Frierman, E.M., Andrews, J.D., 1976. Occurrence of hematopoietic neoplasms in Virginia oysters (*Crassostrea virginica*). *Journal of the National Cancer Institute*. 56 (2), 319-324.
- Fuentes, J., et al., 2002. Growth, mortality, pathology conditions and protein expression of *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* crosses cultured in the Ría de Arousa (NW of Spain). *Aquaculture*. 213, 233-251.
- Gabai, V.L., et al., 2000. Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death. *Molecular Cellular Biology*. 20, 6826-6836.
- Gagnaire, B., et al., 2004. In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. 16, 501-512.
- Gagnaire, B., et al., 2006. Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. *Aquaculture*. 254, 606-616.
- Gagnaire, B., et al., 2008. Comparison of hemocytes parameters in the pericardial cavity and the adductor muscle sinus in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. 16, 501-512.
- Galimany, E., Sunila, I., 2008. Several cases of disseminated neoplasia in Mussels *Mytilus edulis* (L.) in Western Long Island Sound. *Journal of Shellfish Research*. 27, 1201-1207.
- Gam, M. et al., 2008. Metazoanparasites in an intermediate host population near its southern border: the common cockle (*Cerastoderma edule*) and its trematodes in a Moroccan coastal lagoon (Merjas Zerja). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 88, 357-364.
- Gardner, G.R., et al., 1988. Tumor development in American oysters and winter flounder exposed to a contaminated marine sediment under laboratory and field conditions. *Aquatic Toxicology*. 11, 403-404.
- Gardner, G.R., et al., 1991. Germinomas and teratoid siphon anomalies in softshell clams, *Mya arenaria*, environmentally exposed to herbicides. *Environmental Health Perspectives*. 90, 43-51.
- Gavrieli, Y., et al., 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*. 119, 493-501.
- Gilman, J., Myatt, M., 1998. EpiCalc 2000. Version 1.02. Brixton Books. <http://www.brixtonhealth.com/epicalc.html>.
- Goater, C.P., 1993. Population biology of *Meiogymnphallus minutus* (Trematoda: Gymnophallidae) in cockles *Cerastoderma edule* from the Exe estuary, England. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 73, 163-177.
- Goedken, B., et al., 2005. Immunomodulation of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* cellular defense mechanisms by *Perkinsus marinus*. *Journal of Shellfish Research*. 24, 487-496.
- Goedken, M., De Guise, S., 2004. Flow cytometry as a tool to qualify oyster defense mechanisms. *Fish and Shellfish Immunology*. 16, 539-552.
- Gómez-Bautista, M., et al., 2000. Detection of infectious *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and Cockles (*Cerastoderma edule*). *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5), 1866-1870.
- Gómez-Lázaro, M., et al., 2004. La proteína p53 en procesos neurodegenerativos en sus 25 años de historia. *Revisiones en neurociencia*. 39, 243-250.
- González-Tizón, A., et al., 2000. Polyploidy in a natural population of mussel, *Mytilus trossulus*. *Genome*. 43, 409-411.
- Green, M.A., Alderman, D.J., 1983. Neoplasia in *Mytilus edulis* L. from United Kingdom waters. *Aquaculture*. 30, 1-10.
- Green, T.J., et al., 2008. Parasites, pathological conditions and mortality in QX-resistant and wild-caught Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata*. *Aquaculture*. 280 (1-4), 35-38.
- Greenblatt, M.S., et al., 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*. 54, 4855-4878.
- Groner, M.L., et al., 2014. Host demography influences the prevalence and severity of eelgrass wasting disease. *Diseases of Aquatic Organisms*. 108, 165-75.

- Guillou, J., et al., 1990. Les modalités de la reproduction de la coque (*Cerastoderma edule*) sur le littoral français de la Manche et de l'Atlantique. *Aquatic Living resource*. 3, 29-41.
- Gutiérrez, M., and Sarasquete, M.C., 1986. Un caso de hemocitosarcoma hialino en el mejillón, *Mytilus edulis* L. (Pelecípoda: mytilidae) de la costa N.O. de España. *Investigaciones Pesqueras* 50, 265-269.
- Harshbarger, J.C., et al., 1979. Proliferative disorders in *Crassostrea virginica* and *Mya arenaria* from Cheasapeake Bay and intranuclear virus-like inclusions in *Mya arenaria* with germinomas from a Maine oil spill site. *Haliotis*. 8, 243-248.
- Healy, A.M., et al., 1992. Heat shock proteins in cellular defense mechanisms and immunity. *Annals New York Academy of Sciences*. 663, 319-329.
- Helmbrecht, K., et al., 2000. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Proliferation*. 33, 341-365.
- Hennessey, E.S., et al., 1993. Molecular genetics of actin function. *Biochemistry*. 282, 657-671.
- Hepper, B.T., 1953. Artificial infection of various mollusk with *Mytilicola intestinalis*, Steuer. *Nature*. 172(4371), 250.
- Hesselman, D.M., et al., 1988. Gonadal neoplasm in Hard Shell Clams *Mercenaria spp.*, from Indian River, Florida: Ocurrence, prevalence, and histopatology. *Journal of Invertebrate Pathology*. 52, 436-446.
- Hillman, R.E., et al., 1992. Relationship of environmental contaminants to occurrence of neoplasia in mussels (*Mytilus edulis*) from east and west coast Mussel Watch sites. *Proceedings of the Marine Technology Society Journal*. 1, 230-239.
- Holbrook, L.A.C., et al., 2009. Soft-shell clam (*Mya arenaria*) p53: A structural and functional comparison to human p53. *Gene*. 433, 81-87.
- House, M.L., et al., 1998. Soft shell clams *Mya arenaria* with disseminated neoplasia demonstrate reverse transcriptase activity. *Diseases of Aquatic Organisms*. 34, 187-192.
- Howard, A., Smith, C., 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25, Woods Hole.
- Iglesias, D., 2006. Estudio patológico de las poblaciones de berberecho *Cerastoderma edule* (L.) de Galicia. Tesis doctoral, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- Iglesias, D., et al., 2012. Histological survey of Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*. 111(3), 244-51.
- Insua, A., Thirioy-Quévieux, C., 1992. Karyotypes of *Ceratoderma edule*, *Venerupis pullastra* and *Venerupis rhomboides* (Bivalvia, Veneroidea). *Aquatic Living Resources*. 5, 1-8.
- Jaattela, M., et al., 1998. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *European Molecular Biology Organization Journal*. 17, 6124-6134.
- James, B.L., Sannia, A., Bowers, E.A., 1977. Parasites of birds and shellfish. Problems of a small estuary. En: *Proceedings of the symposium on the Burry Inlet (South Wales)*. A. Nelson-Smith and E.M. Bridges (Ed.), The University College of Swansea, pp.1-16.
- Jolly, C., Morimoto, R.I., 2000. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *National Cancer Institute*. 92, 1564-1572.
- Jones, A.M., et al., 1979. The incidence of the nemertine *Malacobdella grossa* in the bivalve *Cerastoderma edule* in Shetland). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kindom*. 59, pp. 373-375.
- Jonsson, R., André, C. 1992. Mass mortality of the bivalve *Cerastoderma edule* on the Swedish west coast caused by infestation with the digenean trematode *Cercaria* C.e I. *Ophelia*, 36 (2), 151-157.
- Kagley, A.N., et al., 2003. Assessment of seasonal variability of cytochemical responses to contaminant exposure in the blue mussel *Mytilus edulis* (Complex). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 44, 43-52.
- Kelley, M.L., et al., 2001. Expression of homologues for p53 and p73 in the softshell clam (*Mya arenaria*), a naturally-occurring model for human cancer. *Oncogene*. 20, 748-758.
- Kelley, M.L., Van Beneden, R. J., 2000. Identification of an E3 ubiquitin-protein ligase in the softshell clam (*Mya arenaria*). *Marine Environmental Research*. 50, 289-293.
- Kent, M.L., et al., 1989. Impaired Defense Mechanisms in Bay Mussels, *Mytilus edulis*, Wiyh Hemic Neoplasia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53, 378-386.
- Kent, M.L., et al., 1991. Failure of transmission of hemic neoplasia of bay mussels, *Mytilus trossulus*, to Other Bivalve Species. *Journal of Invertebrate Pathology*. 57, 435-436.

- Kim, Y., Powell, E.N., 2004. Surfclam histopathology survey along Delmarva mortality line. *Journal of Shellfish Research*. 23, 429-441.
- Koulman, J.G., Wolf, W.S., 1977. The Mollusca of estuarine region of the rivers Rhine, Meuse and Scheldt in relation to the hydrography of the area V. *Cardiidae*. *Bateria*. 41, 21-23.
- Krishnakumar, P.K., et al., 1999. Environmental contaminants and the prevalence of hemic neoplasia (leukemia) in the common mussel (*Mytilus edulis*) from Puget Sound, Washington, USA. *Journal of Invertebrate Pathology*. 73, 135-146.
- Lamatsch DK, et al., 2011. Isolation of a cancer-associated microchromosome in the sperm-dependent parthenogen *Poecilia formosa*. *Cytogenetic and Genome Research*. 135(2), 135-142.
- Landsberg, J.H., 1996. Neoplasia and biotoxins in bivalves: is there a connection? *Journal of Shellfish Research*. 15(2), 203-230.
- Lassalle, G., et al., 2007. Parasite co-infection of two sympatric bivalves, the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) and the cockle (*Cerastoderma edule*) along a latitudinal gradient. *Aquatic Living Resources*. 20, 33-42.
- Lauckner, G. 1971. Zur Trematodenfauna der Herzmuscheln *Cardium edule* und *Cardium lamarcki*. *Helgoländer wiss. Meeresunters*. 22, 377-400.
- Lauckner, G. 1983. Diseases of mollusca: Bivalvia. En: *Diseases of Marine Animals*, Vol. II. Biologische Anstalt Helgoland. O. Kinne (Ed.), Hamburg. pp. 477-961.
- Le Grand, F., et al., 2010. Prevalence, intensity, and aneuploidy patterns of disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*) from Archachon Bay: Seasonal variation and position in sediment *Journal Invertebrate Pathology*. 104, 110-118.
- Le Grand, F., et al., 2013. Altered membrane lipid composition and functional parameters of circulating cells in cockles (*Cerastoderma edule*) affected by disseminated neoplasia. *Chemistry and Physics of Lipids*. 167-168, 9-20.
- Leavitt, D.F. et al., 1994. Initiation and promotion of hematopoietic neoplasia in softshells, *Mya arenaria*, exposed to natural sediments. En: Rosenfield A., Kern F.G., Keller B.J. (Eds.), *Invertebrate Neoplasia: Initiation and Promotions Mechanisms*. U.S. Department of Commerce, Woods Hole, MA., pp. 23-25.
- Leavitt, D.F., et al., 1990. Hematopoietic neoplasia in *Mya arenaria*: prevalence and indices of physiological condition. *Marine Biology*. 105, 313-321.
- Leitao, A., et al., 2006. Restriction enzyme digestion chromosome banding of two commercially important venerid bivalve species: *Ruditapes decussatus* and *Cerastoderma edule*. *Journal of Shellfish Research*. 25, 857-863.
- Levan, A., et al., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52, 201-220.
- Levan, A., et al., 1968. Chromosomes of a human neuroblastoma: a new case with accessory minute chromosomes. *Journal of the National Cancer Institute*. 41, 1377-1387.
- Li, C.Y., et al., 2000. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome C release and upstream of caspase-3 activation. *Journal of Biological Chemistry*. 275, 25665-25671.
- Longshaw, M., Malham, S. K., 2012. A review of the infectious agents, parasites, pathogens and commensals of European cockles (*Cerastoderma edule* and *Cerastoderma glaucum*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 1-21.
- López C, et al., 2011. Pathology of sword razor shell (*Ensis arcuatus*) and grooved razor shell (*Solen marginatus*). En: *Razor clams: biology, Aquaculture and fisheries*. Guerra, A., Lodeiros, C., Baptista, M., da Costa, F. (Ed.), Consellería do Mar, Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, p 131-168.
- Lowe S.W., L.A., 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 21(3), 485-495.
- Lowe, D.M., Moore, M.N., 1978. Cytology and quantitative cytochemistry of a proliferative atypical hemocytic condition in *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mollusca). *Journal of the National Cancer Institute*. 60, 1455-1459.
- Mackin, J.G., Schlicht, F.G., 1976. A proteomyxan amoeba stage in the development of *Labrinthomyxa patuxent* (Hogue) Mackin and Schlicht, with remarks on the relation of the proteomyxids to the neoplastic diseases of oysters and clams. *Marine Fisheries Review*. 38, 16-18.
- Malmsten, A., et al., 2005. Improved HIV-1 viral load determination based on reverse transcriptase activity recovered from human plasma. *Journal of Medical Virology*. 76, 291-296.
- Mann, R., et al., 2009. Population Studies of the Native Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, (Gmelin, 1791) in the James River, Virginia, USA. *Journal of Shellfish Research*. 28, 193-220.

- Manso, C.F., et al., 2012. Detection of reverse transcriptase activity in golden carpet shell clams (*Venerupis aurea*) with disseminated neoplasia. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists. 32, 56-63.
- Martínez-Castro, C., Vázquez, E., 2012. Reproductive Cycle of the Cockle *Cerastoderma edule* (Linnaeus 1758) in the Ría De Vigo (Galicia, Northwest Spain). Journal of Shellfish Research. 31, 757-767.
- Martín-Gómez, L., et al., 2013. Identification of relevant cancer related-genes in the flat oyster *Ostrea edulis* affected by disseminated neoplasia. Marine Biotechnology. 15, 159–174.
- Martín-Gómez, L., et al., 2014. Cloning and characterization of neoplasia-related genes in flat oyster *Ostrea edulis*. Infection Genetics and Evolution. 23, 138–149.
- Matias, A.M., et al., 2014. Karyotype variation in neoplastic cells associated to severity of disseminated neoplasia in the cockle *Cerastoderma edule*. Aquaculture. 428–429, 223–225.
- McGladdery, S.E., et al., 2001. Haemic neoplasia in soft-shell clams (*Mya arenaria*): recent outbreaks in Atlantic Canada and discovery of a p53 gene homologue associated with the condition. Bulletin of Aquaculture. 101(3), 19-26.
- McLaughlin, S.M., 1994. Transmission studies of sarcoma in the softshell, *Mya arenaria*. In: Invertebrate Neoplasia: Initiation and Promotion Mechanisms. Rosenfield, A., Kern, F.G. & Keller, B.J. (Ed.). U.S. Department of Commerce, Woods Hole, MA. pp. 21-22.
- McLaughlin, S.M., et al., 1996. An update on softshell clam (*Mya arenaria*) sarcoma in the Chesapeake Bay and the declining fishery. Proceedings 88th Annual Meeting of the National Shellfisheries Association. pp.53
- Medina, D.J., et al., 1993. Isolation of infectious particles having reverse transcriptase activity and producing hematopoietic neoplasia in *Mya arenaria*. Journal of Shellfish Research. 12, 112–113.
- Mejuto, J., 1984. Contribución al estudio de la dinámica de la población de berberecho, *Cerastoderma edule* (L.), en la Ría de Noia, (Galicia). Cuadernos da Area de Ciencias Mariñas, Seminario de Estudos Galegos. 1, 453-467.
- Metzger, M.J., et al., 2015. Horizontal transmission of clonal cancer cells causes leukemia in Soft-Shell Clams. Cell. 161, 255–263.
- Meyer, G.R., et al., 2010. Health status of Olympia oysters (*Ostrea lurida*) in British Columbia, Canada Journal of Shellfish Research. 29, 181-185.
- Miosky, D.L., et al., 1989. Leukemia Cell Specific Protein of the Bivalve Mollusc *Mya arenaria*. Journal of Invertebrate Pathology. 53, 32-40.
- Mix, M., et al., 1979. Observations on the ultrastructure of large cells associated with putative neoplastic disorders of mussels, *Mytilus edulis*, from Yaquina Bay, Oregon. Journal of Invertebrate Pathology. 34, 41-56.
- Mix, M.C., 1975. Proliferative characteristics of atypical cells in native oysters (*Ostrea lurida*) from Yaquina Bay, Oregon. Journal of Invertebrate Pathology. 26, 289-298.
- Mix, M.C., 1983. Haemic neoplasms of bay mussels, *Mytilus edulis* L., from Oregon: occurrence, prevalence, seasonality and histopathological progression. Journal of Fish Diseases. 6, 239 - 248.
- Mix, M.C., Breese, W.P., 1980. A cellular proliferative disorder in oysters (*Ostrea chilensis*) from Chiloe, Chile, South America. Journal of Invertebrate Pathology. 36, 123-124.
- Mix, M.C., et al., 1978. Neoplastic disease in bivalve mollusks from Oregon estuaries with emphasis on research on proliferative disorders in Yaquina Bay oysters. Annals of the New York Academy of Sciences. 298, 356-373.
- Molares, J., et al., 2008. Variabilidad Interanual de las Ventas de los Principales Recursos Marisqueros de Galicia y su Relación con las Condiciones Ambientales. Revista Galega dos Recursos Mariños (Artículo Información Técnica). 2, 1-42.
- Moll, U.M., et al., 1992. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 89, 7262-7266.
- Moll, U.M., et al., 1995. Wild type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 92, 4407-4411.
- Möller, W., et al., 2005. Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages: role of intracellular calcium. Particle and Fibre Toxicology. 2-7, 1-12.
- Moore, C.A., et al., 1992. Cytoskeletal structure of diseased and normal hemocytes of *Mya arenaria*. Journal of Invertebrate Pathology. 60, 141-147.
- Moore, J., Elston, R. A., 1993. Pathogenesis of disseminated neoplasia in eastern Pacific *Mytilus trossulus*. Journal of Shellfish Research. 12, 136.

- Moore, J.D., et al., 1991. Alternate pathogenesis of systemic neoplasia in the bivalve mollusk. *Journal of Invertebrate Pathology*. 58, 231-243.
- Morga, B., et al., 2009. Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies in vitro haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish and Shellfish Immunology*. 26, 836-842.
- Morgan, E., et al., 2012. Influence of disseminated neoplasia, trematode infections and gametogenesis on surfacing and mortality in the cockle *Cerastoderma edule*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 98, 73-84.
- Morrison, C.M., et al., 1993. Disseminated sarcomas of soft-shell clams, *Mya arenaria* Linnaeus 1758, from sites in Nova Scotia and New Brunswick. *Journal Shellfish Research*. 12, 65-69.
- Mosser, D.D., et al., 2000. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular Cellular Biology*. 16, 1126-1137.
- Murgia, C., et al., 2006. Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell* 126, 477-487.
- Muttray, A.F., et al., 2005. Identification and phylogenetic comparison of p53 in two distinct mussel species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 140 (2), 237-50.
- Muttray, A.F., et al., 2007. Identification of DeltaN isoform and polyadenylation site choice variants in molluscan p63/p73-like homologues. *Marine Biotechnology*. 9, 217-230.
- Muttray, A.F., et al., 2008. Invertebrate p53-like mRNA isoforms are differentially expressed in mussel haemic neoplasia. *Marine Environmental Research*. 66 (4), 412-21.
- Muttray, A.F., et al., 2010. An invertebrate mdm homolog interacts with p53 and is differentially expressed together with p53 and ras in neoplastic *Mytilus trossulus* haemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 156B, 298-308.
- Muttray, A.F., et al., 2012. Haemocytic leukemia in Prince Edward Island (PEI) soft shell clams (*Mya arenaria*): spatial distribution in agriculturally impacted estuaries. *Science of the Total Environment*. 424, 130-142.
- Nascimento, I.A., et al., 1986. Pathological findings in *Crassostrea rhizophorae* from Todos os Santos Bay, Bahias, Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*. 47, 34C-349.
- Neff, J., et al., 1987. Histopathologic and biochemical responses in Arctic marine bivalves molluscs exposed to experimentally spilled oil. *Artic*. 40, 220-229.
- Newman, M.S., 1972. An oyster neoplasm of apparent mesenchymal origin. *Journal of the National Cancer Institute*. 48, 237-243.
- Nikolaev, A.Y., et al., 2003. Parc: A Cytoplasmic Anchor for p53. *Cell*. 112, 29-40.
- Noël, D., 1998. Etude des hématocytes et d'une néoplasie hématocytaire chez les moules *Mytilus edulis* et *Mytilus trossulus* (Molusca, Bivalva). Tesis doctoral, Université de Bordeaux, Bordeaux.
- Noël, D., et al., 1991. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against neoplastic hemocytes of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms*. 10, 51-88.
- Nylandsted, J., et al., 2000. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 97, 7871-7876.
- Odintsova, N.A., et al., 2011. Naturally occurring and artificially induced tumor-like formations in marine invertebrates: A search for permanent cell lines. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 407, 241-249.
- Olberding, K.E., et al., 2004. A HECT E3 ubiquitin-protein ligase with sequence similarity to E6AP does not target p53 for degradation in the softshell clam (*Mya arenaria*). *Mutation Research*. 552, 61-71.
- Oprandy, J.J., Chang, P. W., 1983. 5 - Bromodeoxyuridine Induction of hematopoietic neoplasia and retrovirus activation in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 42, 196-206.
- Oprandy, J.J., et al., 1981. Isolation of a viral agent causing hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 38, 38-45.
- Ordás, M.C., Figueras, A., 2005. Histopathological study of abnormal mortalities of cockle (*Cerastoderma edule*) in Carril (Galicia, NW Spain). *Bulletin European Association of Fish Pathologists*. 25(3), 124-130.
- Oren, M., 2003. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differentiation*. 10, 431-442.
- Parada, J.M., et al., 2007. Temperatura y salinidad en el banco marisquero de "Lombos do Ulla" (Ría de Arousa, Galicia) entre 2002 y 2006: Datos diarios. *Revista Galega dos Recursos Mariños (Datos)*: 1, 226 pp. [on line] <http://www.recmar-galicia.org/>.

- Pariseau, J., et al., 2009. Potential link between exposure to fungicides chlorothalonil and mancozeb and haemic neoplasia development in the soft-shell clam *Mya arenaria*: a laboratory experiment. *Marine Pollution Bulletin*. 58, 503–14.
- Pearse, A.G.E., 1980. The chemistry and practice of fixation. In: *Histochemistry*. A. Pearse, (Ed.), Churchill Livingstone, Edinburg, pp. 97-158.
- Pearse, A.M., and Swift, K., 2006. Allograft theory: transmission of devil facial tumour disease. *Nature*. 439-549.
- Peeler, E.J., Taylor, N.G.H., 2011. The application of epidemiology in aquatic animal health -opportunities and challenges. *Veterinary Research*. 42-94.
- Pekkarinen, M., 1993. Neoplastic diseases in the Baltic *Macoma balthica* (Bivalvia) off the Finnish Coast. *Journal of Invertebrate Pathology*. 61, 138-146.
- Peters, E.C., 1988. Recent Investigations on the disseminated sarcomas of marine bivalve molluscs. *American Fisheries Society Special Publication*. 18, 74-92.
- Peters, E.C., et al., 1994. Comparative histopathology of gonadal neoplasms in marine bivalve molluscs. *Diseases of Aquatic Organisms*. 20, 59-76.
- Peters, E.C., Lehtonen, K.K., 1997. Chemical and other stressors in the Gulf of Riga: interpreting multiple lesions in the clam *Macoma balthica*. *Journal of Shellfish Research*. 16, 351-354.
- Pierre, R., et al., 1971. Microchromosomes in human preleukemia and leukemia *Cancer Cell*. 27, 160-175.
- Pina, S., et al., 2009. Morphological and molecular studies on life cycle stages of *Diphtherostomum brusinae* (Digenea: Zoogonidae) from northern Portugal. *Journal of Helminthology*. 83, 321-331.
- Pockley, A.G., 2003. Heat shock proteins as regulators of the immune response. *The Lancet*. 362, 469-476.
- Poder, M., Auffret, M., 1986. Sarcomatous lesion in the cockle *Cerastoderma edule* L. Morphology and population survey in Brittany, France. *Aquaculture*. 58, 1-8.
- Potts, M.S., 1993. Effects of hematopoietic neoplasia on physiological processes in the soft-shell clam, *Mya arenaria* (Linne.) Tesis doctoral, University of New Hampshire, Durham.
- Potts, M.S., 1996. Effects of hematopoietic neoplasia on reproduction and population size distribution in soft-shell clam. *Journal of Shellfish Research*. 15, 519.
- Pyra, H., et al., 1994. Ultrasensitive retrovirus detection by a reverse transcriptase assay based on product enhancement. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 91, 1544-1548.
- Rasmussen, L.P.D., 1986. Occurrence, prevalence and seasonality of neoplasia in the marine mussel *M. edulis* from three sites in Denmark. *Marine Biology*. 92, 59-64.
- Reed, J., 2003. Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell*. 3, 17-22.
- Reinisch, C.L., et al., 1983. Unique antigens on neoplastic cells of the soft Shell Clam *Mya arenaria*. *Developmental and comparative immunology*. 7, 33-39.
- Reinisch, C.L., et al., 1984. Epizootic neoplasia in soft shell clams collected from New Bedford Harbor. *Hazard Waste*. 1, 73-81.
- Reno, P.W., et al., 1994. Flow cytometric and chromosome analysis of softshell clams, *Mya arenaria*, with disseminated neoplasia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 64, 163-172.
- Robert, J., 2003. Evolution of heat shock protein and immunity. *Developmental and Comparative Immunology*. 27, 449-464.
- Roderick, H.L., Cook, S.J., 2008. Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nature Reviews Cancer*. 8, 361-375.
- Rodríguez, H., et al., 1997. A case of disseminated haemic sarcoma in *Cerastoderma (=cardium) glaucum* (Poiret, 1789) collected from Ría de Vigo (NW Spain). *Bulletin European Association of Fish Pathologists*. 17(3/4), 88-90.
- Rojas, P., et al., 1999. Hemocytic neoplasia in the Chilean oyster (*Tiostrea chilensis*) cultured in the south of Chile. New record. *Investigaciones Marinas Valparaíso*. 27, 15-18.
- Romalde J.L., et al., 2002. Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve molluscs from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. *The International Journal of Food Microbiology*. 74, 119-130.
- Romalde, J.L., et al., 2007. Evidence of retroviral etiology for disseminated neoplasia in cockles (*Cerastoderma edule*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 94, 95-1001.
- Royds, J., Iacopetta, B., 2006. p53 and disease: when the guardian angel fails. *Cell death and differentiation*. 13, 1017-1026.
- Ruiz, M., et al., 2013a. Histological survey of symbionts and other conditions of pod razor clam *Ensis siliqua* (Linnaeus, 1758) in Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*. 112, 74-82.

- Ruiz, M., et al., 2015. Marteilia sp. and other parasites and pathological conditions in *Solen marginatus* populations along the Galician coast (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*. 112, 177-184.
- Ruiz, P., et al., 2013b. Biomarkers and transcription levels of cancer-related genes in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain) with disseminated neoplasia. *Aquatic Toxicology*. 136-137, 101-111.
- Ruiz, Y., et al., 2011. Environmental quality of mussel farms in the Vigo estuary: pollution by PAHs, origin and effects on reproduction. *Environmental Pollution*. 159, 250-265.
- Russell-Pinto, F. 1990. Differences in infestation intensity and prevalence of hinge and mantle margin *Meiogymnophallus minutus* Metacercariae (*Gymnophallidae*) in *Cerastoderma edule* (*Bivalvia*): Possible species coexistence in Ría de Aveiro. *Journal of Parasitology*. 76 (5), 653-659.
- Russell-Pinto, F., 1993. Espécies de digenea que infectam *C. edule* (n.v. berbigão) em Portugal. Caracterização da resposta do hospedeiro a infestação. Tesis doctoral. Universidad de Oporto, Oporto.
- Russell-Pinto, F., et al., 1994. Haemocytes in *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia): distinct cell types engage in different responses to sheep erythrocytes. *Fish & Shellfish Immunology*. 4, 383-397.
- Russell-Pinto, F., et al., 2006. Digenean larvae parasitizing *C. edule* (Bivalvia) and *Nassarius reticulatus* (Gastropoda) from Ria de Aveiro, Portugal. *Journal of Parasitology*. 92, 319-332.
- Samain, J.F., et al., 2007. Genetically based resistance to summer mortality in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and its relationship with physiological, immunological characteristics and infection processes. *Aquaculture*. 268, 227-243.
- Sanders, B.M., 1993. Stress Proteins in Aquatic Organisms: An Environmental Perspective. *Critical Reviews in Toxicology*. 23, 49-75.
- Scholz, T., 2002. Family Gymnophallidae Odhner, 1905. En: *Keys to the Trematoda*. Gibson D.I., Jones A. and Bray R.A. (Ed.), Wallingford, UK: CABI, pp. 245-251.
- Schumacker, P.T., 2006. Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell*. 10(3), 175-176.
- Seed, R., Brown, R.A., 1975. The influence of reproductive cycle, growth, and mortality on population structure in *Modiolus modiolus* (L.), *Cerastoderma edule* (L.) and *Mytilus edulis* L., (Mollusca: Bivalvia). *Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium*. 257-274.
- Shi, G., et al., 2003. Death decoy receptor TR6/DcR3 inhibits T cell chemotaxis *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Immunology*. 171, 3407-3414.
- Siah, A., et al., 2008a. Patterns of p53, p73 and mortalin gene expression associated with hemocyte polyploidy in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98, 148-152.
- Siah, A., et al., 2008b. Selecting a set of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in normal and tetraploid haemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*. *Fish Shellfish Immunology*. 25, 202-207.
- Siah, A., et al., 2011. Induction of transposase and polyprotein RNA levels in disseminated neoplastic hemocytes of soft-shell clams: *Mya arenaria*. *Developmental and Comparative Immunology*. 35, 151-154.
- Siah, A., et al., 2012a. Expression of RAS-like members, a-jun and c-myc mRNA levels in neoplastic hemocytes of soft-shell clams *Mya arenaria* using microsphere-based 8-plex branched DNA assay. *Results in Immunology*. 2, 83-87.
- Siah, A., et al., 2012b. Single plex branched DNA as an alternative assay to quantify p53-like mRNA levels in softshell clam *Mya arenaria* hemocytes. *Journal of Shellfish Research*. 31(3), 691-696.
- Siah, A., et al., 2013. Transcriptome analysis of neoplastic hemocytes in soft-shell clams *Mya arenaria*: focus on cell cycle molecular mechanism. *Results in Immunology*. 3, 95-103.
- Skowrya, D., et al., 1990. The *Escherichia coli* dnaK gene product, the hsp70 homologue, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell*. 62, 939-944.
- Smolarz, K., et al., 2005a. Neoplasia detection in *Macoma balthica* from the Gulf of Gdansk: comparison of flow cytometry, histology and chromosome analysis. *Diseases of Aquatic Organisms*. 65, 187-195.
- Smolarz, K., et al., 2005b. Survey for neoplasia in *Macoma balthica* from the Gulf of Gdansk by flow cytometry. *Diseases of Aquatic Organisms*. 66, 41-46.
- Smolarz, K., et al., 2005c. Histology, cytogenetics and cytofluorimetry in diagnosis of neoplasia in *Macoma balthica* (Bivalvia, L.) from the southern Baltic Sea. *Caryologia*. 58, 212-219.
- Smolarz, K., et al., 2005d. Recent trends in the prevalence of neoplasia in the Baltic clam *Macoma balthica* (L.) from the Gulf of Gdansk (Baltic Sea). *Oceanologia*. 47, 61-74.
- Smolarz, K., et al., 2006. Ultrastructural study of neoplastic cells in *Macoma balthica* (Bivalvia) from the Gulf of Gdansk (Poland). *Journal of Invertebrate Pathology*. 92, 79-84.

- Smolowitz, R., Leavitt, D., 1996. Neoplasia and other pollution associated lesions in *Mya arenaria* from Boston Harbor. *Journal of Shellfish Resource*. 15, 520.
- Smolowitz, R.M., et al., 1989. Ontogeny of leukemic cells of the soft shell clam. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53, 41-51.
- Smolowitz, R.M., Reinisch, C.L. 1986. Indirect peroxidase staining using monoclonal antibodies specific for *Mya arenaria* neoplastic cells. *Journal of Invertebrate Pathology*. 48, 139-145.
- Snyder, M.J., et al., 2001. Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 41, 22-29.
- Song, J., et al., 2001. Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nature Cell Biology*. 3, 276-282.
- Sparks, A.K. 1985. Synopsis of invertebrate pathology. Exclusive of Insects. Elsevier, Amsterdam.
- Spriggs, A., et al., 1962. Chromosomes of human cancer cells. *British Medical Journal*. 2, 1431-1435.
- Steele A.J., et al., 2005. Detection of serum reverse transcriptase activity in patients with ALS and unaffected blood relatives. *Neurology*. 64, 454-458.
- Stephens, R.E., et al., 2001. Multiple protein differences distinguish clam leukemia cells from normal haemocytes: evidence for the involvement of p53 homologues. *Comparative biochemistry and physiology, toxicology and pharmacology*. 129, 329-338.
- Stifanic, M., et al., 2009. P63 in *Mytilus galloprovincialis* and p53 family members in the phylum *Mollusca*. *Comparative Biochemistry and Physiology. B*, 154, 264-273.
- St-Jean, S.D., et al., 2005. Detecting p53 family proteins in haemocytic leukemia cells of *Mytilus edulis* from Pictou Harbour, Nova Scotia, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 62, 2055-2066.
- Strandberg, J.D., et al., 1998. Specific localization of polychlorinated biphenyls in clams (*Mya arenaria*) from environmentally impacted sites. *Aquatic Toxicology*. 41, 343-354.
- Sunila, I., 1987. Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the *Tvarminne area*, Gulf of Finland (Baltic Sea). *Annales Zoologici Fennici*. 24, 55-69.
- Sunila, I., 1991. Respiration of sarcoma cells from the soft-shell clam *Mya arenaria* L. under various conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 150, 19-29.
- Sunila, I., 1992. Serum-cell interactions in transmission of sarcoma in the soft shell clam, *Mya arenaria* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 102A, 727-730.
- Sunila, I., Dungan, C. F., 1992. Different proteins in the hemolymph sera from sarcomatus and healthy soft shell clams, *Mya arenaria* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 102B, 621-625.
- Sunila, I., Farley, C.A., 1989. Environmental limits for survival of sarcoma cells from the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 7, 111-115.
- Sunila, I., Labanca, J., 2003. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 56, 163-170.
- Sunila, I., Viral transmission and tumor promotion of sarcoma in the softshell, *Mya arenaria*. En: *Invertebrate neoplasia: Initiation and promotion mechanisms*. A. Rosenfield, et al., (Ed.), U.S. Department of Commerce, Woods Hole, M.A., 1994, pp. 3-5.
- Taraska, N.G., Böttger, S.A., 2013. Selective initiation and transmission of disseminated neoplasia in the soft shell clam *Mya arenaria* dependent on natural disease prevalence and animal size. *Journal of Invertebrate Pathology*. 112, 94-101.
- Thieltges, D.W., Reise, K., 2006. Metazoan parasites in intertidal cockles *Cerastoderma edule* from the northern Wadden Sea. *Sea Research*. 56, 284-293.
- Thiriou-Quévroux, C., Ayraud, N., 1982. Les Caryotypes de quelques espèces de bivalves et de gastéropodes marins. *Marine Biology*. 70, 165-172.
- Thiriou-Quévroux, C., Wolowicz, M., 2001. Chromosomal study of spatial variation of the prevalence of a gill neoplasia in *Macoma balthica* (L.) from the gulf of Gdansk (Baltic Sea). *Ophelia*. 54, 75-81.
- Thomas, L., et al., 2004. Double minute chromosomes in monoblastic (MS) and myeloblastic (M2) acute myeloid leukemia: two case reports and a review of literature. *American Journal of Hematology*. 77, 55-61.
- Tiscar, M.F., 2004. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Veterinary Research Communications*. 28, 57-62.
- Twomey, E., 1994. Distribution of sarcoma in the cockle, *Cerastoderma edule*, around the Irish Coast, 1982-91: Implications for pollution etiology. En: *Invertebrate neoplasia: initiation and promotion mechanisms*. Rosenfield, A., Kern, F.G., Keller, B.J. (Eds.) US Department of Commerce, Woods Hole, MA, USA, pp. 3-5.

- Twomey, E., Mulcahy, M.F., 1984. A proliferative disorder of possible haemic origin in the common cockle, *Cerastoderma edule*. *Journal Invertebrate Pathology*. 44, 109-111.
- Twomey, E., Mulcahy, M.F., 1988a. Epizootiological aspects of a sarcoma in the cockle *Cerastoderma edule*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 5, 225-238.
- Twomey, E., Mulcahy, M.F., 1988b. Transmission of a sarcoma in the cockle *Cerastoderma edule* (Bivalvia; Mollusca) using cell transplants. *Developmental and Comparative Immunology*. 12, 195-200.
- Usheva, L.N., Frolova, L.T., 2000. Neoplasia in the connective tissue of the mussel *Mytilus trossulus* from polluted areas of Nakhodka Bay, Sea of Japan. *The Russian Journal of Developmental Biology*. 31, 53-60.
- Van Beneden, R.J., 1994. Molecular analysis of bivalve tumors: models for environmental/genetic interaction. *Environmental Health Perspectives*. 102, 81-83.
- Van Beneden, R.J., et al., 1993. Implications for the presence of transforming genes in gonadal tumors in two bivalve mollusk species. *Cancer Research*. 53, 2976-2979.
- Vassilenko, E., Baldwin, S.A. 2014. Using flow cytometry to detect haemic neoplasia in mussels (*Mytilus trossulus*) from the Coast of Southern British Columbia, Canada. *Journal of Invertebrate Pathology*. 117, 68-72.
- Vassilenko, E., et al., 2010. Variations in p53-like cDNA sequence are correlated with mussel haemic neoplasia: a potential molecular-level tool for biomonitoring. *Mutation Research*. 701, 145-152.
- Villalba, A., et al., 1995. Disseminated sarcoma in the clam *Ruditapes decussatus* in Galicia (NW Spain). *Journal of Invertebrate Pathology*. 65, 76-78.
- Villalba, A., et al., 2001. Disseminated neoplasia and large foci indicating heavy haemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms*. 46, 213-216.
- Villalba, A., et al., 2014. Cockle *Cerastoderma edule* fishery collapse in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain) associated with the protistan parasite *Marteilia cochillia*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 109, 55-80.
- Voisset, C., et al., 2001. Specific detection of RT activity in culture supernatants of retrovirus-producing cells, using synthetic DNA as competitor in polymerase enhanced reverse transcriptase assay. *Journal of Virological Methods*. 94, 187-193.
- Walker, C., et al., 2006. Mortalin-based cytoplasmic sequestration of p53 in a nonmammalian cancer model. *American Journal of Pathology*. 168, 1526-1530.
- Walker, C., et al., 2009. Mass culture and characterization of tumor cells from a naturally occurring invertebrate cancer model: applications for human and animal disease and environmental health. *Biology Bulletin*. 216, 23-29.
- Walker, C.W., Böttger, S.A., 2008. A naturally occurring with molecular connectivity to human diseases. *Cell cycle*. 7, 2286-2289.
- Walker, H.A, et al., 1981. A comparison of the incidence of five pathological conditions in softshell clams, *Mya arenaria*, from environments with various pollution histories. *Marine Environmental Research*. 5, 109-123.
- Walter, J., et al., 2007. An estimator of episodic mortality in bivalves with an application to sea scallops (*Placopecten magellanicus*). *Fisheries Research*. 86, 85-91.
- Weinberg, J.R., et al., 1997. Experimental field studies with *Mya arenaria* (Bivalvia) on the induction and effect of hematopoietic neoplasia. *Journal of invertebrate pathology*. 69, 183-194.
- White, M.K., et al., 1993. The expression of an adhesion-related protein by clam hemocytes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 61, 253-259.
- Wickner, S., et al., 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding and degrading proteins. *Science*. 286, 1888-1893.
- Wolf, P.H., 1979. Diseases and parasites in Australian commercial shellfish. *Haliotis*. 8, 75-83.
- Wolowicz, M., et al., 2005. Neoplasia in estuarine bivalves: Effect of feeding behaviour and pollution in the Gulf of Gdansk (Baltic Sea, Poland). En: *Comparative Roles of Suspension-Feeders in Ecosystems*, Dame, R.F., Olenin, S. (Eds.), pp. 165-182.
- Xue QG, R.T., Chiltonczyk S., 2001. Flow cytometric assessment of haemocyte sub-populations in the European flat oyster, *Ostrea edulis*, haemolymph. *Fish and Shellfish Immunology*. 11, 557-567.
- Yakovleva, N.V., et al., 2001. The Diversity of Strategies of Defense from Pathogens in Molluscs. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 37, 358-367.
- Yevich, P.P., Barry, M.M., 1969. Ovarian Tumors in the Quahog *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 14, 266-267.

- Yevich, P.P., Barszcz, C.A., 1976. Gonadal and hematopoietic neoplasm in *Mya arenaria*. Marine Fisheries Review. 38, 42-43.
- Yevich, P.P., Barszcz, C.A., 1977. Neoplasia in soft-shell clams (*Mya arenaria*) collected from oil-impacted sites. Annals New York Academy of Sciences. 409-426.
- Zorita, I., et al., 2007. Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW. Mediterranean Sea using mussels as sentinel organisms. Environmental Pollution. 148, 236-250.
- Zylicz, M., et al., 2001. Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. The European Molecular Biology Organization Journal. 20, 4634-4638.

