



Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular
Universidade de Santiago de Compostela

Estudio de la respuesta inmune en
hemocitos en *Mytilus galloprovincialis*
Lmk.

Memoria presentada por
Ana Novás Maseda
para optar al grado de Doctora en Biología

Lugo, septiembre de 2005

La presente memoria ha originado la siguiente publicación:

Novás, A., Cao, A., Barcia, R. y Ramos-Martínez, J.I. (2004). Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 390-394.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación XUGA 26100 PB96 y PGIDT MAR26102PR de la Secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento de la Xunta de Galicia.



Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular
Universidade de Santiago de Compostela

D. Juan Ignacio Ramos-Martínez, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela, y **D. Ramiro Barcia Vieitez**, Profesor Titular del mismo departamento,

INFORMAN:

Que la presente memoria con título “**Estudio de la respuesta inmune en hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* Lmk.**” elaborada por la licenciada en Biología, **Dña. Ana Novás Maseda**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria de Lugo y hallándose concluida, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctora en Biología, especialidad Bioquímica y Biología Molecular.

Lugo, septiembre de 2005

Fdo. J.I. Ramos-Martínez

Fdo. R. Barcia Vieitez

Fdo. A. Novás Maseda

*“Atreverse,
es no hacer pie por un momento,
no atreverse,
es perderse a uno mismo para siempre.”
Sören Kierkegaard*

A m i madre

A Litri

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. El modelo experimental: <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lmk.	3
2. Inmunidad: sistemas y respuestas inmunitarias	6
2.1 Células y tejidos del sistema inmune en invertebrados	7
2.1.1 Poblaciones celulares en hemolinfa de moluscos bivalvos	8
2.2 El lipopolisacárido bacteriano y las citoquinas en la respuesta inmune	11
3. Óxido nítrico y sistema inmunitario	13
3.1 El nitrógeno	13
3.2 El óxido nítrico	15
3.3 Enzimas responsables de la síntesis de óxido nítrico	16
3.3.1 Clasificación de las óxido nítrico sintetasas	17
3.3.1.1 Isoformas constitutivas (cNOS)	18
I. Óxido nítrico sintetasa neuronal/NOS1/nNOS	18
II. Óxido nítrico sintetasa endotelial/NOS3/eNOS	19
3.3.1.2 Isoforma inducible (iNOS)	19
3.3.2 Estructura de las óxido nítrico sintetasas	20
3.3.3 Grupos prostéticos	23
3.3.3.1 NADPH y flavín nucleótidos (FAD, FMN)	23
3.3.3.2 Calmodulina (CaM)	25
3.3.3.3 Tetrahydrobiopterina (BH ₄)	26
3.3.3.4 Grupo hemo	28
3.3.4 Regulación de las óxido nítrico sintetasas	29
3.3.4.1 Factores de transcripción NFκB	29
3.3.4.2 Óxido nítrico	30
3.3.4.3 Proteínas asociadas a las óxido nítrico sintetasas	31
3.3.4.3.1 Proteína quinasas	31
I. Proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA)	31

<i>II. Proteína quinasa dependiente de calcio (PKC)</i>	32
<i>3.3.4.3.2 Proteínas de estrés térmico (Hsp_s)</i>	32
4. Transmisión de señales en la respuesta inmune	33
<i>4.1 Proteína quinasas</i>	33
<i>4.1.1 PKA</i>	33
<i>4.1.1.1 PKA en Mytilus galloprovincialis Lmk.</i>	35
<i>4.1.2 PKC</i>	36
<i>4.1.2.1 Estructura molecular de la PKC</i>	37
<i>4.1.2.2 Fosforilación de la PKC</i>	38
<i>4.1.2.3 Translocación de la PKC</i>	39
<i>4.1.2.4 PKC en Mytilus galloprovincialis Lmk.</i>	40
5. Apoptosis o muerte celular programada	41
<i>5.1 Fases de la apoptosis</i>	42
<i>5.2 Regulación de la apoptosis</i>	44
<i>5.2.1 Óxido nítrico</i>	44
<i>5.2.2 Citoquinas</i>	46
<i>5.2.3 Receptores de superficie</i>	47
OBJETIVOS	53
MATERIAL Y MÉTODOS	57
1. Material biológico	59
2. Reactivos	59
3. Aparatos	60
4. Procedimientos generales	61
5. Extracción de hemolinfa y obtención de hemocitos	61
6. Cultivo de hemocitos de mejillón	62

7. Tampones y soluciones	62
7.1 <i>Tampón Alseve (ALS)</i>	63
7.2 <i>Inactivación del suero fetal bovino (FCS)</i>	63
7.3 <i>ALS suplementado</i>	63
7.4 <i>Medio de cultivo celular: Leibovitz L-15 suplementado</i>	64
7.5 <i>Tampón de extracción de proteínas de citosol</i>	64
7.6 <i>Tampón de extracción de proteínas de membrana</i>	65
8. Preparación de lisados de hemocitos	65
9. Electroforesis en geles de poli(acrilamida)-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)	66
9.1 <i>Composición de los geles</i>	68
9.2 <i>Preparación de los geles</i>	69
9.3 <i>Tinción de los geles con azul Coomassie</i>	70
10. Western-blotting: Transferencia de proteínas e inmunodetección	70
10.1 <i>Transferencia de proteínas</i>	70
10.2 <i>Inmunodetección con anti-iNOS, anti-eNOS y anti-p105</i>	71
11. Determinación de la producción de óxido nítrico	71
12. Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos	73
12.1 <i>Extracción de ADN</i>	73
12.2 <i>Determinación de la concentración de ADN</i>	74
13. Electroforesis en geles de agarosa	75
13.1 <i>Composición y preparación de los geles</i>	76
14. Método estadístico	77
RESULTADOS	79
1. Cultivo primario de hemocitos obtenidos de hemolinfa de mejillón	81
2. Estudio de la producción de NO por <i>Mytilus galloprovincialis</i> Lmk.	82
2.1 <i>Producción de óxido nítrico y expresión proteica en hemocitos</i>	82
2.1.1 <i>LPS</i>	82

2.1.2 TNF- α	86
2.1.3 IL-2	89
2.1.4 PDGF	92
2.1.5 TGF- β_1	95
3. Rutas de señalización implicadas en la producción de óxido nítrico	98
3.1 Implicación de la PKA en la producción de óxido nítrico	98
3.2 Implicación de la PKC en la producción de óxido nítrico	99
4. Inmunodetección de óxido nítrico sintetasas	100
4.1 Óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS)	101
4.2 Óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS)	104
5. Presencia de p105 en hemocitos de <i>Mytilus galloprovincialis</i>	106
6. Comportamiento de hemocitos de mejillón durante los años 2003-2004	109
7. Estudio de las poblaciones de hemocitos de <i>M. galloprovincialis</i>	113
8. Inducción de apoptosis	115
DISCUSIÓN	119
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFÍA	139
ABREVIATURAS	193
ANEXO	199

1. El modelo experimental: *Mytilus galloprovincialis* Lmk.

En las costas europeas está comprobada la existencia de tres especies diferentes de mejillón (*M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*). En contra de lo que se creía hasta hace poco en que se identificaba al mejillón gallego como *Mytilus edulis*, estudios morfológicos y genéticos han confirmado que los mejillones presentes en las costas de Galicia pertenecen al Phylum Mollusca, Clase Bivalvia, Orden Mytiloidea, Género *Mytilus*, Especie *galloprovincialis* (Sanjuan *et al.*, 1987).

Los mejillones del género *Mytilus* se localizan en aguas litorales y sublitorales poco profundas, tanto en litoral abierto como en estuarios de aguas salobres. Preferentemente se asientan en lugares de aguas movidas y viven de forma sésil adheridos por medio del biso a sustratos resistentes, como rocas, guijarros y arenas de mar compactas. El tipo de vida, así como su localización litoral lo exponen a las condiciones típicas de la vida intermareal, en la cual uno de los principales condicionantes es la exposición periódica al aire durante la marea baja. El límite superior de supervivencia de esta zona viene impuesto por la duración del período de exposición al aire y por el grado de humedad disponible durante ese tiempo.

Los moluscos bivalvos son animales protóstomos celomados, con simetría bilateral (o secundariamente asimétricos) y no segmentados. Presentan una concha que se encuentra formada por dos valvas iguales, unidas dorsalmente y entre las cuales se dispone el cuerpo y la cavidad paleal. Las valvas están constituidas por un delgado periostraco de naturaleza orgánica, la conquiolina, que recubre una serie de dos a cuatro capas calcáreas, que a su vez, suelen estar formadas por aragonito o una mezcla de aragonito y calcita. Cada valva presenta una

protuberancia dorsal denominada umbo, a partir de la que se pueden apreciar líneas de crecimiento concéntricas (Brusca y Brusca, 2005) (Figura 1).

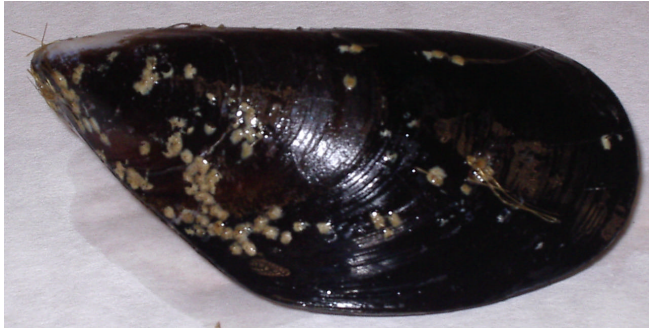


Figura 1. Ejemplar de *Mytilus galloprovincialis* Lmk

La musculatura se encuentra adherida a la concha y son los músculos aductores, anterior y posterior, los más destacados. Estos músculos están constituidos por dos tipos de fibras, estriadas y lisas, lo que les permite cerrar las valvas rápidamente y durante largos períodos de tiempo (Durán *et al.*, 1990; Brusca y Brusca, 2005) (Figura 2).

En la cavidad paleal sobresalen las branquias, que además de actuar como órgano respiratorio, colaboran en la alimentación. Los bivalvos y concretamente *M. galloprovincialis* son animales filtradores que adquieren el alimento suspendido en el agua del mar por un mecanismo de tamizado por medio de cilios. El agua es arrastrada a través de los poros que hay en las branquias y las partículas alimentarias quedan pegadas a una capa de mucus.

El aparato digestivo de este organismo está diferenciado en boca (rodeada de palpos labiales), esófago, estómago e intestino, rodeado de glándula digestiva o hepatopáncreas. La mayor parte de los procesos digestivos tienen lugar en los divertículos digestivos, que comunican el estómago con el hepatopáncreas (Brusca y Brusca, 2005).

En la glándula digestiva o hepatopáncreas coexisten dos tipos celulares, las células digestivas o acidófilas y las piramidales o basófilas, caracterizadas por poseer un extenso retículo endoplasmático, abundancia de ribosomas, aparato de Golgi muy activo y numerosas vesículas apicales, rasgos típicos de células que sintetizan y secretan proteínas (Owen, 1966).

El manto es el principal tejido de reserva del molusco y permanece adherido a la concha por unas fibras musculares que constituyen la línea o seno paleal. El borde del manto presenta tres pliegues: externo, medio e interno. El pliegue externo se relaciona con la secreción de la concha; el medio desempeña la función sensorial, mientras que el pliegue interno contiene músculos radiales y circulares, involucrados en el movimiento del agua dentro de la cavidad del manto.

El pie es un órgano musculoso, con forma de hoja y comprimido lateralmente, cuyos movimientos se consiguen por una combinación de acciones musculares y de presión hidráulica. Secreta gránulos de naturaleza proteica, que posteriormente se endurecen en forma de filamentos, constituyendo el biso, cuya función es el anclaje del molusco.

Los moluscos presentan un sistema circulatorio abierto y la hemolinfa desempeña diversas funciones en el molusco, entre las que destacan el transporte de un pigmento respiratorio (la hemocianina), la defensa del organismo frente a patógenos y el soporte corporal, puesto que el hemocele funciona como un esqueleto hidrostático (Marshall y Williams, 1980; Durán *et al.*, 1990; Brusca y Brusca, 2005).

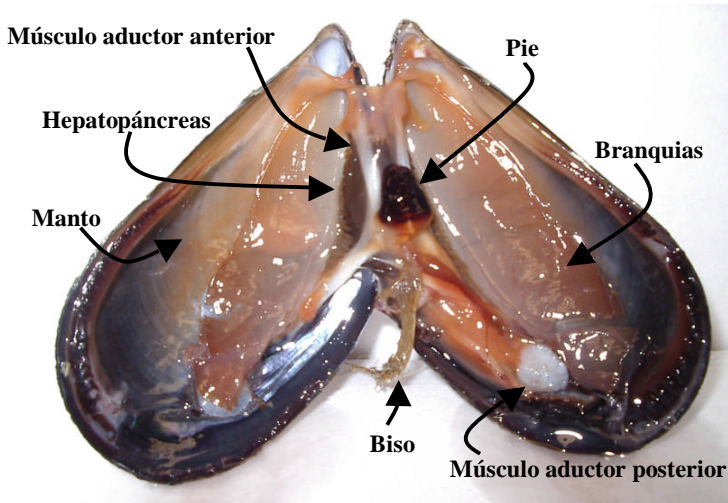


Figura 2. Morfología de un individuo de la especie *Mytilus galloprovincialis*

2. Inmunidad: sistemas y respuestas inmunitarias

La respuesta inmune ha sido definida tradicionalmente, como un sistema antimicrobiano no específico para autolimitar la respuesta inflamatoria (Miyajima *et al.*, 1992). El sistema inmune en todos los animales comprende elementos celulares y humorales que interaccionan para proteger al organismo de patógenos, parásitos y células neoplásicas (Ratcliffe *et al.*, 1985; Smith, 1991), de forma que todos los organismos manifiestan una capacidad determinada genéticamente para distinguir entre lo propio y lo extraño. Las bases moleculares para los mecanismos de reconocimiento y respuesta del efector varían según los niveles de organización biológica (Nappi y Ottaviani, 2000; Nappi y Vass, 2000).

Los organismos multicelulares poco evolucionados sólo presentan un tipo de inmunidad, denominada innata que es exclusivamente celular y filogenéticamente más antigua que la inmunidad adquirida, que está presente en

organismos como peces (cartilagosos y óseos), anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Thompson, 1995).

2.1 Células y tejidos del sistema inmune en invertebrados

En el sistema circulatorio de invertebrados, se detecta una gran variedad de tipos de células sanguíneas (Ratcliffe y Rowley, 1979; 1981), las cuales, aparentemente, desempeñan funciones variadas como son transporte, almacenamiento, reparación de heridas y pigmentación, así como defensa del organismo. De acuerdo con su papel biológico poseen especializaciones estructurales, bioquímicas y de comportamiento.

Los invertebrados carecen de respuestas inmunes adaptadas que son características de mamíferos, pero poseen una respuesta inmune innata que incluye la acción de componentes humorales y celulares (Nappi y Vass, 1993; Carton y Nappi, 1997; Nappi y Ottaviani, 2000; Nappi y Vass, 2000).

La inmunidad humoral incluye la activación de cascadas proteolíticas que finalizan en la opsonización y la síntesis de varios péptidos antimicrobianos (Meister *et al.*, 1997, Hoffman *et al.*, 1999; Bulet *et al.*, 1999; Engstrom, 1999).

Las respuestas celulares son realizadas por hemocitos (Söderhäll y Smith, 1983, Smith y Söderhäll, 1983; 1991), los cuales poseen la capacidad de fagocitar patógenos y desarrollar el proceso de encapsulación de metazoos (Nappi y Vass, 1993; Carton y Nappi, 1997; Nappi y Ottaviani, 2000; Nappi y Vass, 2000).

El análisis microscópico y funcional de los hemocitos sugiere fundamentalmente la presencia de tres tipos celulares: células hialinas, células semigranulares y células granulares (Söderhäll y Smith, 1983, Smith y Söderhäll, 1983; 1991). Las células hialinas carecen de grandes gránulos distintivos, presentando una gran actividad fagocítica (Bauchau, 1981; Smith y Söderhäll, 1983). Otros autores, afirman que en el citoplasma de este tipo celular aparecen

algunos pequeños gránulos basófilos. Las células granulares y semigranulares son de mayor tamaño que las hialinas, presentando gránulos acidófilos, basófilos o incluso de ambos tipos (Carballal *et al.*, 1997). Estos gránulos intracelulares pueden descargarse al exponer a la célula frente a materiales no propios (Smith y Söderhäll, 1983).

2.1.1 Poblaciones celulares en hemolinfa de moluscos bivalvos

Los hemocitos en invertebrados tienen una importancia clave en las reacciones de defensa de estos organismos (Pipe *et al.*, 1997). Existen diferentes opiniones en relación al número y tipo de hemocitos en moluscos bivalvos, así como en su clasificación celular. La existencia de diversos tipos de clasificación se debe a la variabilidad de técnicas empleadas, que abarcan desde las morfológicas hasta la citometría de flujo (Soares da Silva *et al.*, 2002) (Figura 3).

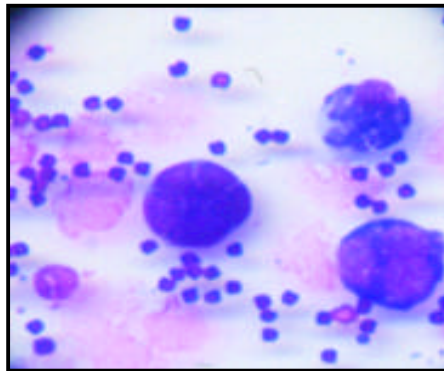


Figura 3. Poblaciones celulares en hemolinfa de moluscos bivalvos (Barcia *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2003, 2004a)

En *Anadonta cygnea*, los hemocitos pueden englobarse en dos categorías, granulocitos e hialinocitos. Los primeros, son células de gran tamaño, con un núcleo excéntrico, pseudópodos, numerosos gránulos y mitocondrias abundantes,

además son la población que aparece en mayor número, concretamente un 75% del total. La actividad peroxidasa desarrollada por las mitocondrias y la movilidad desempeñada por los pseudópodos, encontrada sólo en esta población celular de hemocitos, indica su supuesta implicación en la fagocitosis (Lanz *et al.*, 1993; Glinski y Jarosz, 1997; Soares da Silva *et al.*, 2002). El segundo tipo de hemocitos, los hialinocitos, son células pequeñas, con forma oval, sin pseudópodos, con escasa representación (sólo el 25% del total) y con actividad de defensa citotóxica en la hemolinfa (Soares da Silva *et al.*, 2002).

La clasificación de hemocitos en *Mytilus edulis*, ha recibido históricamente considerable atención (Jones, 1846; Williams, 1852; Sabatier, 1877; Flemming, 1878; Kollmann, 1980; Feng *et al.*, 1977; Moore y Lowe, 1977; Rasmussen *et al.*, 1985; Pipe, 1990a; Koehn, 1991; Noël *et al.*, 1994). En estudios iniciales, se clasificaron varias fases de su desarrollo incluyendo estados granulares finos y gruesos, así como células nucleadas, incluyéndose descripciones de aglomeraciones y la formación de pseudópodos (Jones, 1846). Una de las clasificaciones, describe la caracterización antigénica de dos subpoblaciones con anticuerpos monoclonales y reconoce tres clases de hemocitos (Pipe *et al.*, 1997).

Los hemocitos de *M. edulis* pueden dividirse en dos grupos, basófilos y eosinófilos; en el primer grupo se incluyen células hialinas y granulares, mientras que en el grupo de los eosinófilos sólo se encuentran células granulares (Friebel y Renwranz, 1995; Pipe *et al.*, 1994). A su vez, los hemocitos granulares de *M. edulis* contienen dos tipos distintos de gránulos, que se diferencian en tamaño, contenido enzimático y características de tinción con lectinas (Pipe, 1990b; 1992; Dyrzynda *et al.*, 1997).

En la hemolinfa de *M. galloprovincialis* han sido detectados dos tipos diferentes de células (Barcia *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2003, 2004a). En primer lugar, un grupo de células pequeñas redondeadas, denominadas células RH, con un

núcleo que ocupa casi la totalidad de la célula y un pequeño volumen de citoplasma, que a veces es tan sólo un halo alrededor del núcleo (Figura 4). Esta morfología recuerda a las células RH aisladas a partir de hemolinfa de *P. corneus* (Ottaviani *et al.*, 1993a) o los hialinocitos aislados de la hemolinfa de *M. edulis* (Pipe *et al.*, 1997).

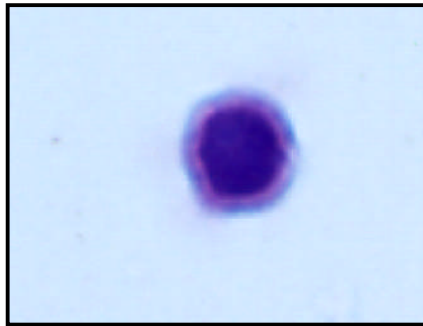


Figura 4. Células RH de hemolinfa de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Barcia *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2003, 2004a)

El segundo tipo celular encontrado en hemolinfa de *M. galloprovincialis*, presenta un mayor tamaño y un citoplasma expandido (células SH) (Figura 5), siendo similares a las SH aisladas en *P. corneus* (Ottaviani *et al.*, 1993a), recordando a su vez la estructura de macrófagos de vertebrados y eosinófilos detectados en *M. edulis* (Pipe *et al.*, 1997).

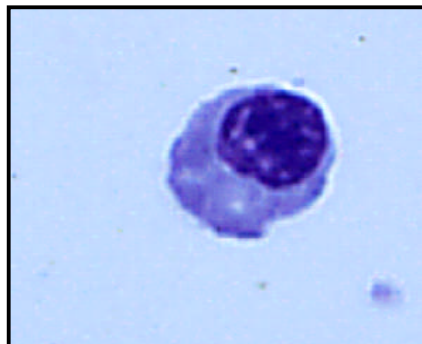


Figura 5. Células SH de hemolinfa de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (Barcia *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2003, 2004a)

2.2 El lipopolisacárido bacteriano y las citoquinas en la respuesta inmune

La respuesta inmune está regulada por múltiples y complejas interacciones entre moléculas, las cuales desencadenan señales de transducción intercelulares. Algunas de estas moléculas importantes en la respuesta inmunitaria son el lipopolisacárido bacteriano y las citoquinas (Gómez *et al.*, 1998).

El lipopolisacárido o LPS es el principal componente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas (Pipe *et al.*, 1997; Lien *et al.*, 2000) y posee la capacidad para activar macrófagos de vertebrados (Celada y Nathan, 1994; Chen *et al.*, 2003; Khadaroo *et al.*, 2003; Stout *et al.*, 2005) y hemocitos de invertebrados (Ottaviani *et al.*, 1995).

Al activar macrófagos, se desencadena la secreción, entre otros, de óxido nítrico (Ottaviani *et al.*, 1997), citoquinas (Weiss *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005) y la activación de múltiples señales de transducción en las que están implicadas fosfolipasas, proteínas G, proteína quinasas, etc. (Liu *et al.*, 1994; Sweet y Hume, 1996; von Knethen *et al.*, 2005). Al igual que en vertebrados, los hemocitos de invertebrados responden a la acción del LPS mediante cambios conformacionales, incremento de la movilidad y liberación de óxido nítrico (Hughes *et al.*, 1991a; 1991b; Lowestein *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1993).

A su vez, las citoquinas representan un grupo diverso de moléculas que participan en la transducción de señales (Leonard y Lin, 2000) y estas señales, pueden ser de dos tipos, autocrina y/o paracrina (Gómez *et al.*, 1998; Leonard y Lin, 2000).

Tradicionalmente, han sido clasificadas según su origen o función y desde un punto de vista funcional, las citoquinas son:

1. **Redundantes**, distintas citoquinas provocan la misma respuesta.
2. **Pleiotrópicas**, la misma citoquina provoca diferentes respuestas.
3. **Sinérgicas**, la combinación de dos o más citoquinas potencian su respuesta al actuar sobre un mismo tipo celular (Chyczewska y Mroz, 1997; Badovinac *et al.*, 1998; Wald *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003)

En animales superiores, las citoquinas están relacionadas con la inmunidad, la inflamación, el estrés y la regulación de la expresión de diversas proteínas (Arai *et al.*, 1990; Blach-Olszewka, 2005; Gobert *et al.*, 2005).

En invertebrados, los hemocitos no sólo responden a la administración exógena de citoquinas de vertebrados (Hughes *et al.*, 1992; Ottaviani *et al.*, 2004), sino que también han sido detectadas moléculas similares a ellas (Hughes *et al.*, 1992; Stefano *et al.*, 1991; Ottaviani *et al.*, 1993a; Granath *et al.*, 1994).

El empleo de TNF- α , IL-2, PDGF y TGF- β_1 provoca cambios en la forma de los hemocitos, modifica la movilidad de estas células, incrementa la fagocitosis, promueve la síntesis de aminas biógenas (Hughes *et al.*, 1991a; 1992; Ottaviani *et al.*, 1994; Ottaviani *et al.*, 1995), induce las enzimas responsables de la síntesis de óxido nítrico y es conocida la implicación del PDGF y del TGF- β_1 en rutas de transducción de señales a través del fosfatidilinositol y AMPc (Ottaviani *et al.*, 2004). Además, se ha detectado que un tipo celular presente en *Mytilus galloprovincialis*, concretamente, las células SH, expresan la cadena α del receptor de IL-2 (Barcia *et al.*, 1999); mientras que en la membrana plasmática de hemocitos de algunas especies de insectos y de moluscos, han sido detectadas moléculas similares a los receptores de PDGF y TGF- β_1 de vertebrados (Kletsas *et al.*, 1998; Ottaviani *et al.*, 2001).

3. Óxido nítrico y sistema inmunitario

3.1 El nitrógeno

El nitrógeno es un gas diatómico, que forma parte de la atmósfera (78% del volumen). A pesar de su baja reactividad química, el nitrógeno es uno de los 20 bioelementos que entran a formar parte de los seres vivos, con la particularidad de ser el cuarto componente más abundante (1.4%), superado por el oxígeno (25%), el carbono (9.5%) y el hidrógeno (63%). Su importancia proviene de su presencia en biomoléculas como los ácidos nucleicos, proteínas, hormonas, neurotransmisores, vitaminas, coenzimas, fosfolípidos y otros lípidos estructurales complejos.

Como en el caso del carbono y del oxígeno, el nitrógeno está sometido a un ciclo biológico complejo que permite su integración desde el estado diatómico básico en que se encuentra en la atmósfera, hasta el estado reducido que caracteriza su presencia como componente de biomoléculas. Este ciclo comienza con la acción de distintos microorganismos del suelo (*Azotobacter*, *Rhizobium*, *Klebsiella*), que fijan el nitrógeno atmosférico, para que luego, otros microorganismos puedan transformarlo en nitritos y nitratos. En estas formas moleculares sencillas, el nitrógeno puede ser asimilado por las plantas y entrar en la cadena trófica en forma reducida (NH_4) o en la forma oxidada (nitritos, nitratos). El proceso de putrefacción de la materia orgánica devuelve el nitrógeno a la biosfera por un mecanismo de desnitrificación que llevan a cabo bacterias saprófitas.

Finalmente el hombre incide de forma negativa en este ciclo al enviarlo a la atmósfera en forma de residuos industriales de los combustibles fósiles, capaces de reaccionar con el ozono y formar parte de la lluvia ácida (Diehl *et al.*, 1985; Solomon *et al.*, 2001) (Figura 6).

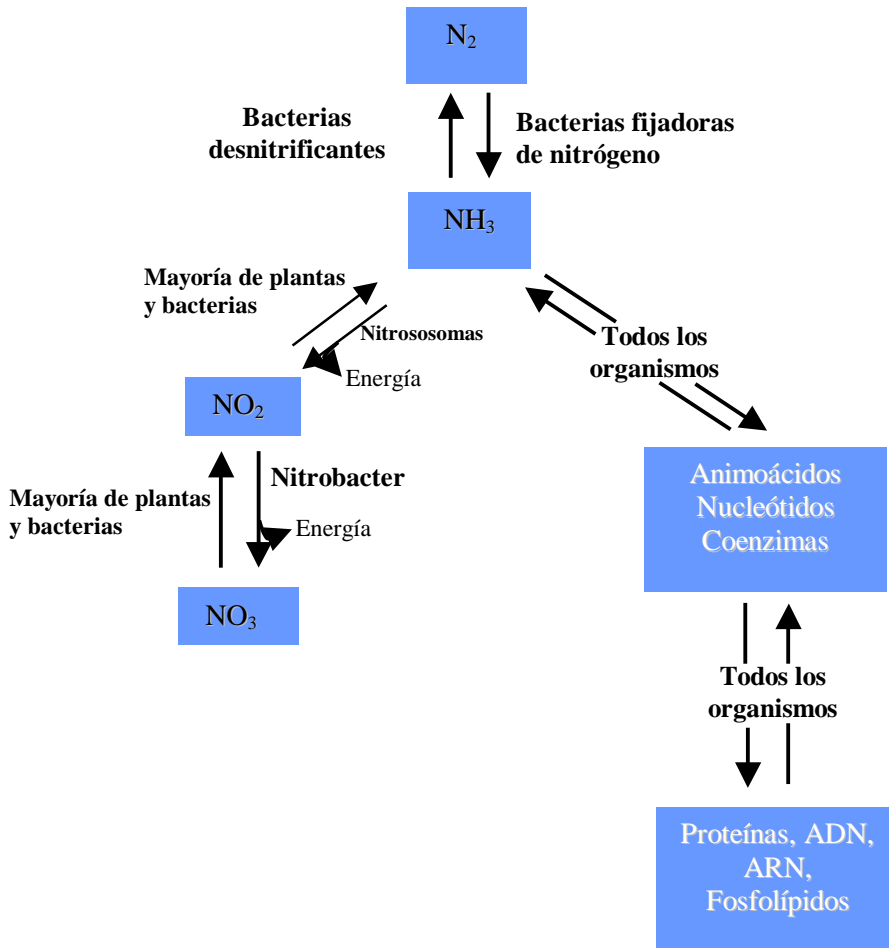


Figura 6. Relaciones entre el metabolismo del nitrógeno inorgánico y orgánico. (Original tomado de Mathews y van Holde, 1998).

3.2 El óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un radical libre, con reactividad alta (Zhang *et al.*, 2003), de baja solubilidad en medio acuoso y con tendencia a existir como gas (Ignarro, 1989; Moncada *et al.*, 1991). Se trata de una molécula de un tamaño de 30 Da (Nathan y Xie, 1994) que interviene en diversos procesos fisiológicos, entre los que se pueden mencionar:

- Homeostasis
- Neurotransmisión
- Respuesta inmunitaria

(Jorens *et al.*, 1991; Bissonnette *et al.*, 1991; Garthwaite, 1991; Belvisi 1992; Kubes, 1992; Moncada, 1992; Alican y Kubes, 1996).

El NO puede involucrarse en lo que algunos autores denominan acciones directas e indirectas. Las acciones directas son aquellas en las que el propio óxido nítrico interactúa con moléculas biológicas; mientras que las indirectas ocurren cuando determinados intermediarios son generados por interacción del NO con especies reactivas del oxígeno (Wink y Mitchell, 1998).

El óxido nítrico posee capacidad para intervenir en respuestas inmunes de tipo no específico. Su participación en estos procesos de defensa, se debe a la elevada efectividad que presenta frente a bacterias, parásitos, virus, células tumorales y antígenos (Beckman *et al.*, 1991; Asano *et al.*, 1994; Robbins *et al.*, 1994), siendo responsable de efectos citotóxicos en macrófagos (Marletta *et al.*, 1988) y neutrófilos de mamíferos (Hibbs *et al.*, 1988). Su potencial de toxicidad se refleja en el caso del estrés oxidativo, como por ejemplo en sistemas deficientes en antioxidantes o en la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Beckman *et al.*, 1991).

En la síntesis del óxido nítrico están involucrados distintos procesos, como la transcripción, procesamiento posttranscripcional y traducción de las enzimas implicadas en dicha síntesis, siendo modulados por citoquinas y factores de crecimiento. Estas moléculas pueden interactuar de forma individualizada o de forma sinérgica (Kwon y George, 1999).

Desde el punto de vista biológico, el óxido nítrico funciona como un segundo mensajero, que interactúa con receptores específicos, provocando un número limitado de respuestas (Hunter, 2000; Kolios *et al.*, 2004).

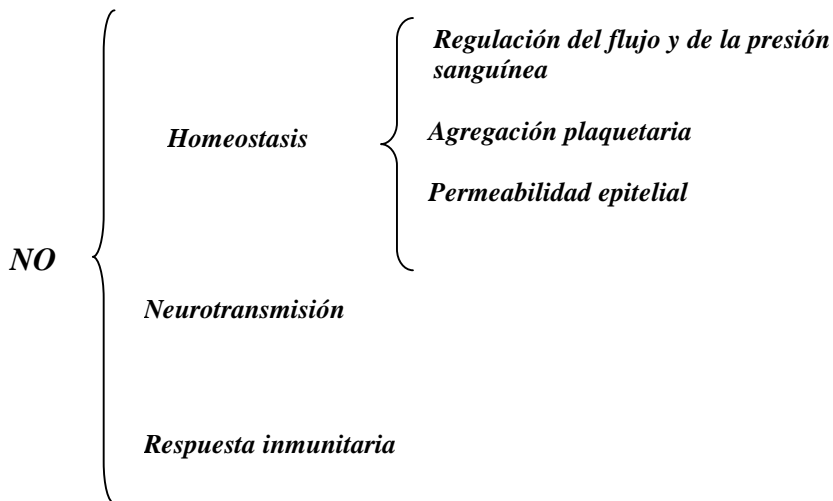


Figura 7. Procesos fisiológicos en los que está implicado el óxido nítrico.

3.3. Enzimas responsables de la síntesis de óxido nítrico

Las enzimas óxido nítrico sintetasas (NOS) (E. C. 1.14.13.39) catalizan la oxidación de L-arginina en presencia de oxígeno molecular y de NADPH, generando óxido nítrico y L-citrulina (Stuehr, 1997; Palmer *et al.*, 1988) (Figura 8).

Las tres isoformas conocidas poseen una estructura molecular y características enzimáticas similares (Chen *et al.*, 1996), las diferencias se reflejan

en su localización celular, dependencia del calcio y funcionalidad (Knudsen *et al.*, 2003).

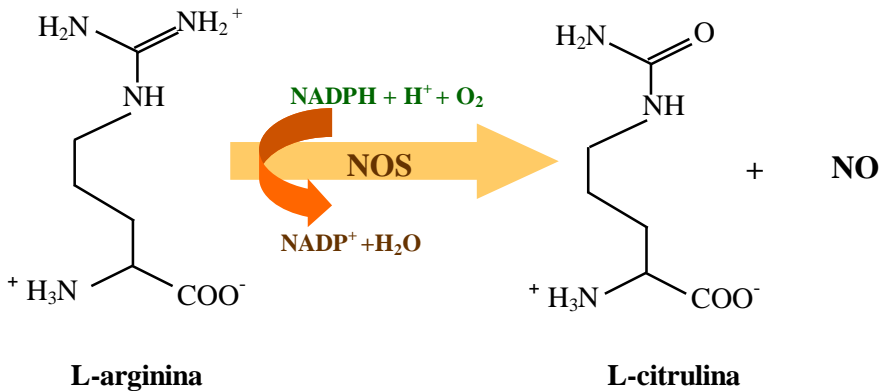


Figura 8. Reacción catalizada por NOS en células de mamíferos

3.3.1 Clasificación de las óxido nítrico sintetasas

Como se ha indicado anteriormente, la clasificación de las tres isoformas de NOS se realiza atendiendo a su distribución tisular y a su dependencia de calcio intracelular. Estas diferencias en la actividad y posterior regulación, se reflejan en las funciones fisiológicas desempeñadas por las enzimas.

<i>Numérica</i>	<i>Descriptiva</i>	<i>Definición</i>
I	nNOS	Dependiente de Ca^{2+} , identificada inicialmente en neuronas.
II	iNOS	Independiente de Ca^{2+} , identificada en macrófagos.
III	eNOS	Dependiente de Ca^{2+} , identificada en células endoteliales.

Tabla 1. Tipos de nomenclatura y definición de las diferentes NOS (Original tomado de Nathan y Xie, 1994).

3.3.1.1 Isoformas constitutivas (cNOS)

Estas isoformas se expresan de un modo permanente, pudiendo ser su actividad variable (Gosgnach *et al.*, 2000). Esta actividad es regulada por la unión reversible a la calmodulina (CaM), siendo éste, un proceso dependiente de concentraciones elevadas de calcio. Es importante destacar que las isoformas constitutivas (NOS endotelial y neuronal) sintetizan niveles de óxido nítrico, que podrían denominarse basales (Konturek y Konturek, 1995).

I. Óxido nítrico sintetasa neuronal/NOS1/nNOS

Esta isoforma se encontró inicialmente en el sistema nervioso, aunque también se ha detectado en neutrófilos, médula adrenal, páncreas y riñón (Boissel *et al.*, 1998). Está regulada por la CaM que a su vez, es activada por calcio (Kopeck y Carrol, 2000). Posee un peso molecular de 160 kDa, aunque puede presentar

variantes debido a deleciones e inserciones (Huang *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1994; Greenburg *et al.*, 1998).

El NO producido por la nNOS funciona como un neurotransmisor en el sistema nervioso central (Busse y Fleming, 1995).

II. Óxido nítrico sintetasa endotelial/NOS3/eNOS

Esta isoforma se localiza fundamentalmente en células endoteliales, aunque ha sido detectada en plaquetas, miocitos cardíacos y células epiteliales. Su peso molecular es de 135 kDa y al igual que la nNOS, se expresa de forma constitutiva dependiente de calmodulina y del calcio intracelular (Busse y Fleming, 1995). Otros autores, afirman que la eNOS puede ser activada en respuesta a estímulos provocados por el estrés, citoquinas y hormonas, aunque los niveles de NO producidos sean bajos (Kopec y Carroll, 2000; Fleming y Busse, 2003).

La principal función del óxido nítrico sintetizado por esta enzima es el mantenimiento del flujo sanguíneo (Busse y Fleming, 1995).

3.3.1.2. Isoforma inducible (iNOS)

Esta óxido nítrico sintetasa inducible/NOS2/iNOS se localiza preferentemente en macrófagos y en microglía de mamíferos (Hibbs *et al.*, 1988; Schmidt *et al.*, 1992; Meda *et al.*, 1995), aunque se ha detectado en otras células como neutrófilos, condrocitos, células del músculo del pie de bivalvos, oligodendrocitos, astrocitos y hepatocitos (Pfeilschifter *et al.*, 1996). La unión de la isoforma inducible a la CaM es motivo de controversia, puesto que algunos autores hacen referencia a un proceso irreversible y calcio-independiente (Knudsen *et al.*, 2003); mientras que otros afirman que la enzima se une débilmente a la CaM (Zhang *et al.*, 2003), lo que provocaría la activación de la isoforma con niveles

basales de Ca^{2+} (Boo y Jo, 2003). Su masa molecular es de 130 kDa (Xie *et al.*, 1996). Esta isoforma inducible, se expresa en respuesta a estímulos inmunológicos como pueden ser los provocados por el lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas (LPS) y citoquinas proinflamatorias ($\text{IFN-}\gamma$) (Hibbs *et al.*, 1988; Schmidt *et al.*, 1992; Meda *et al.*, 1995).

El NO sintetizado por la iNOS, contribuye a la defensa del hospedador debido a la capacidad citotóxica que presenta frente a bacterias, protozoos y células tumorales (Bredt, y Snyder, 1990; Pfeilschifter *et al.*, 1996). Así, una de sus funciones es controlar distintos procesos de la fagocitosis en células inmunes (Franchini *et al.*, 1995; Forslund y Sundquist, 1997).

3.3.2 Estructura de las óxido nítrico sintetasas

La estructura de NOS ha sido conservada a lo largo de la evolución, presentando dos dominios (Boo y Jo, 2003): un dominio carboxilo terminal utilizado básicamente para la unión del NADPH (Cho *et al.*, 1995), FAD y FMN (Bredt *et al.*, 1991); un dominio amino terminal al que se une la tetrahydrobiopterina, el grupo hemo y la L-arginina (Richards y Marletta, 1994; McMillan y Master, 1995; Ghosh y Stuehr, 1995; Kolios *et al.*, 2004); mientras que a la zona hidrofóbica central se une la calmodulina (Marletta, 1993; Bredt y Snyder, 1994) (Figura 9).

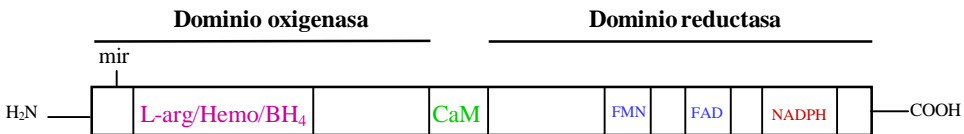


Figura 9. Esquema de la secuencia aminoacídica de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS). Se muestran los lugares de unión para el grupo hemo, calmodulina (CaM), flavín

nucleótidos (FMN, FAD), NADPH y el ácido mirístico (mir) (Original tomado de Kolios *et al.*, 2004).

Estructuralmente, la diferencia entre la NOS endotelial y las otras dos isoformas, es la presencia en el dominio oxigenasa de eNOS, de un sitio consenso para procesos de acilación, concretamente para miristoilación y palmitoilación (Pollock *et al.*, 1992; Busconi y Michel, 1993; Sessa *et al.*, 1993; Sakoda *et al.*, 1995; Robinson y Michel, 1995) (Figura 10).

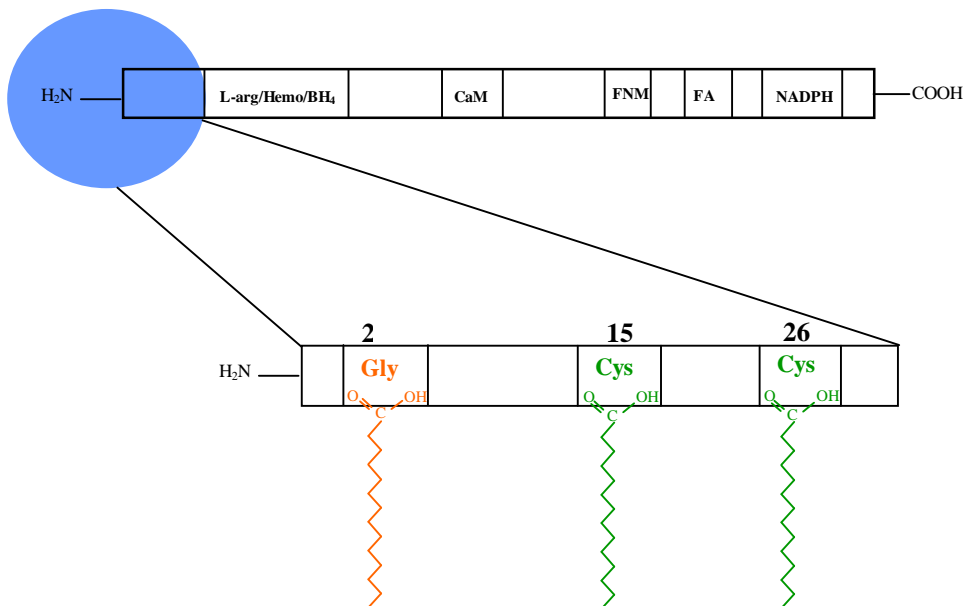


Figura 10. Esquema de la estructura de eNOS y de los sitios de unión para el ácido mirístico (naranja) y para el ácido palmítico (verde) en el dominio amino terminal.

La miristoilación es un proceso irreversible catalizado por la miristoiltransferasa, que consiste en la unión covalente del ácido mirístico a la glicina existente en la posición 2 de la enzima (Boutin, 1997; Farazo *et al.*, 2001). Este proceso hace que eNOS sea más hidrofóbica, lo que le permite asociarse con membranas intracelulares, resultando dicha asociación necesaria para el inicio de

su fosforilación, la activación de la NOS endotelial y producción de NO en respuesta a un estímulo (Sessa *et al.*, 1993; Fulton *et al.*, 2002).

A su vez, la miristoilación es un requisito previo para que ocurra la palmitoilación (Robinson y Michel, 1995; Sessa *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1997; Dunphy y Linder, 1998; Resh, 1999). Este segundo tipo de acilación, consiste en la tiopalmitoilación de un residuo cisteína en la posición 15 o 26, siendo un proceso totalmente reversible (Robinson y Michel, 1995; Galbiati *et al.*, 1999; Melkonian *et al.*, 1999) y catalizado por una enzima (palmitoil-transferasa) que reconoce selectivamente residuos miristoilados (Milligan *et al.*, 1995; Simons y Toomre, 2000; Janes *et al.*, 2000).

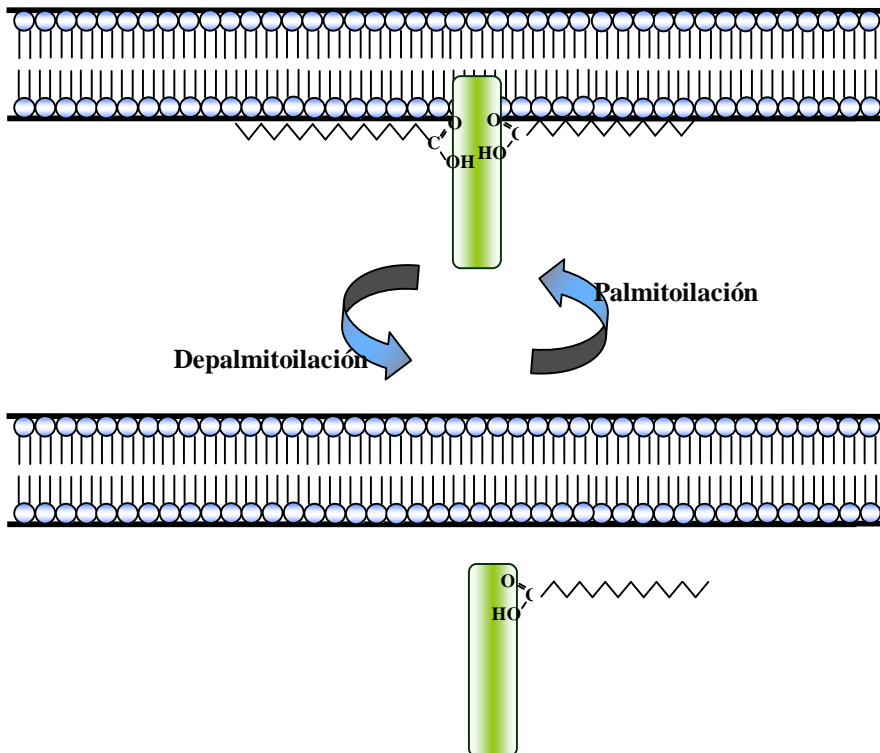


Figura 11. Esquema de la translocación de eNOS desde la membrana hasta el citosol como consecuencia del ciclo de palmitoilación y depalmitoilación.

Se cree que el control de la localización subcelular de determinadas enzimas, entre ellas la eNOS, se debe a ciclos de palmitoilación y depalmitoilación (McCabe y Berthiaume, 1999; Yeh *et al.*, 1999; Simons y Toomre, 2000) (Figura 11), siendo dichos ciclos la razón para que eNOS, no sólo se encuentre asociada a membranas, sino que también pueda translocarse al citosol como consecuencia de una depalmitoilación en respuesta a un estímulo externo (Robinson *et al.*, 1995; Prabhakar *et al.*, 1998).

3.3.3 Grupos prostéticos

Las óxido nítrico sintetasas son catalíticamente activas sólo en forma dimérica (Stuehr *et al.*, 1991a; Giovanelli *et al.*, 1991; Channon, 2004). Para formar dímeros activos son necesarios un sustrato (L-arginina) y varios grupos prostéticos, que facilitan la funcionalidad de las distintas isoformas: FAD, FMN (Stuehr *et al.*, 1991b; Hevel *et al.*, 1991), Ca^{2+} /calmodulina (CaM) (Cho *et al.*, 1992), tetrahidrobiopterina (BH_4) (Kwon *et al.*, 1998; Tayeh y Marletta, 1989) y grupo hemo (Xie *et al.*, 1996) (Figura 12).

3.3.3.1 NADPH y flavín-nucleótidos (FAD, FMN)

El flujo de electrones a las óxido nítrico sintetasas para la síntesis de NO depende de la función de determinados nucleótidos (Abu-Soud *et al.*, 1994; Griffith y Stuerh, 1995). La actividad catalítica de las NOS, implica la transferencia secuencial de electrones desde el NADPH a las flavinas (FAD y FMN), que a su vez, son transferidos al dominio oxigenasa de otro monómero, en donde ocurre la oxidación de la L-arginina (Fleming y Busse, 2003; Channon, 2004).

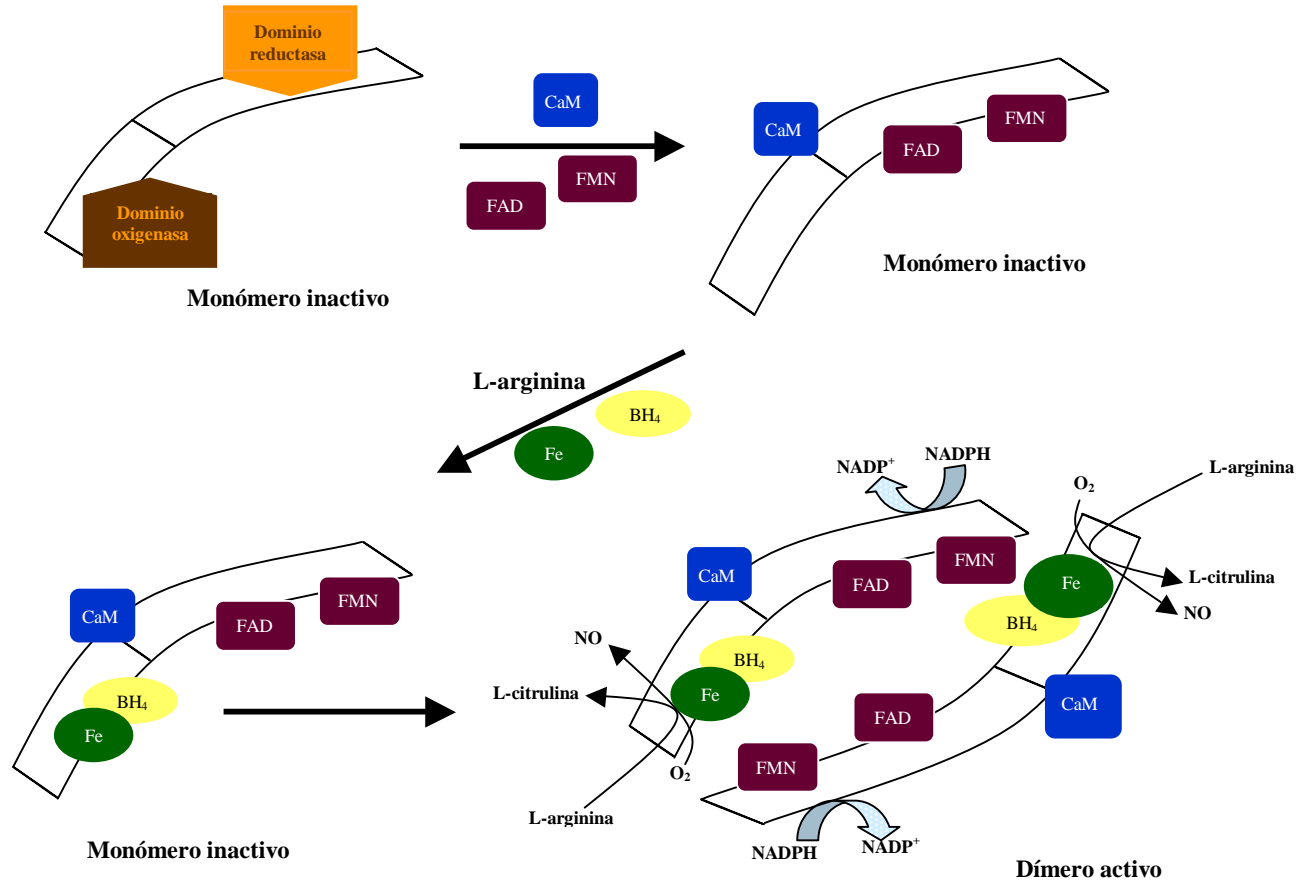


Figura 12. Formación de dímeros activos de óxido nítrico sintetas mediante la unión de distintos grupos prostéticos

3.3.3.2 Calmodulina (CaM)

La calmodulina (CaM) es una proteína pequeña, altamente conservada y ubicua, que posee cuatro lugares de unión para el Ca^{2+} . Una segunda denominación de la proteína como “proteína moduladora del calcio” nos indica la estrecha relación existente entre CaM y el ión calcio (Chin y Means, 2000; Stull, 2001).

Su función se reduce básicamente a dos aspectos:

1. Protección del sitio de unión del sustrato de NOS de la acción de las proteasas (Sheta *et al.*, 1994; Ghosh y Stuehr, 1995)
2. La unión de la CaM a la enzima facilita la transferencia de electrones desde el NADPH a los flavín nucleótidos y de éstos a los aceptores exógenos (Abu-Soud *et al.*, 1994; Fleming y Busse, 2003; Channon, 2004).

Las NOS son sintetizadas en forma monomérica, en estos monómeros se aprecia un dominio oxigenasa, inicialmente no funcional (Sheta *et al.*, 1994) y un dominio reductasa funcional. A esta segunda región, se unen los flavín nucleótidos y el NADPH; mientras que a la región oxigenasa, se unirán la BH_4 y el grupo hemo, en presencia de la L-arginina (Nishimura *et al.*, 1995). Entre ambos dominios, se halla la CaM (Bredt *et al.*, 1991; Cho *et al.*, 1992; Sheta *et al.*, 1994), de forma que esta proteína facilita la transferencia de electrones entre NADPH y flavín nucleótidos y de éstos a la región oxigenasa (Abu-Soud *et al.*, 1994; Christopherson, 1996). Cada una de las óxido nítrico sintetetas posee una limitación para la transferencia de electrones, mostrando mayor dificultad para modular este transporte las isoformas constitutivas (Miller *et al.*, 1999).

En las distintas isoformas existen secuencias consenso para la unión de la calmodulina a las enzimas (Lamas *et al.*, 1992; Lowesntein *et al.*, 1992; Lyons *et*

al., 1992; Xie *et al.*, 1992). La unión de la CaM a las NOS, está mediada inicialmente por interacciones hidrofóbicas. La alta afinidad existente entre CaM-iNOS, podría explicarse por la presencia de un mayor número de residuos hidrofóbicos en iNOS (Aoyagi *et al.*, 2003). En mamíferos, la calmodulina se considera una subunidad dentro de la propia isoforma inducible; consecuentemente, la iNOS resulta independiente de elevadas concentraciones de calcio para su activación (Cho *et al.*, 1992).

Desde un punto de vista bioquímico, la unión de la calmodulina a la isoforma inducible no está regulada por el ión calcio. Por el contrario, en las cNOS, la unión de la CaM es dependiente de Ca^{2+} , siendo un proceso totalmente reversible (Lowenstein *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1992).

3.3.3.3 Tetrahydrobiopterina (BH₄)

La tetrahydrobiopterina actúa como un grupo prostético para la formación de dímeros activos de NOS, además de proporcionar el lugar de unión para la L-arginina, que actúa como sustrato en la síntesis de óxido nítrico (Cho *et al.*, 1995; Channon, 2004).

Podemos destacar tres aspectos por los cuales la BH₄ tiene importancia:

1. La dimerización es obligatoria para la síntesis de óxido nítrico y la tetrahydrobiopterina es esencial para la formación de dímeros estables de NOS (Stuehr *et al.*, 1991a; Baek *et al.*, 1993; Channon, 2004).

2. Al unirse la BH₄ a los monómeros de NOS, se favorece el cambio alostérico del sitio catalítico de la enzima, de forma que el grupo hemo puede unirse más fácilmente al complejo enzimático (Klatt *et al.*, 1994; Raman *et al.*, 1998).

3. La BH_4 ejerce doble protección, por una lado, protege a los homodímeros de la proteólisis por tripsina (Panda *et al.*, 2002); por otro, protege al grupo hemo de la acción del óxido nítrico sobre la propia NOS (Griscavage *et al.*, 1994), evitando que se produzca una modificación del potencial redox (Wang *et al.*, 1995).

El dímero es la forma activa de las óxido nítrico sintetasas y se considera a la BH_4 como la principal promotora de la formación de dímeros, ya que es esencial para la estabilización y el mantenimiento de dímeros activos, así como para regulación la actividad de las distintas isoformas. La producción de óxido nítrico citosólico está correlacionada con un incremento de la tetrahidrobiopterina intracelular (Tzeng *et al.*, 1995).

Un ejemplo de la importancia de la tetrahidrobiopterina para iNOS, es el observado en células NIH 3T3 de recombinantes humanos con una deficiencia en BH_4 , que poseen una baja actividad de la isoforma inducible. Estas células son capaces de recuperar la actividad normal de la enzima, si son incubadas durante un tiempo con BH_4 (Tzeng *et al.*, 1995).

En el caso de la eNOS, cuando se produce una limitación o ausencia de los niveles intracelulares de BH_4 , se produce un descenso en la actividad de la enzima. En primer lugar, el dímero de la NOS endotelial se desestabiliza, lo que supone una reducción de dímeros en relación a los monómeros de eNOS presentes en la célula. En segundo lugar, la actividad catalítica de la enzima se desacopla, en ese momento, puede seguir produciéndose o no la oxidación de la L-arginina; pero sigue ocurriendo la transferencia de electrones, formándose superóxidos y/o peróxidos de hidrógeno. La funcionalidad de eNOS en este momento, está regulada

por mecanismos dependientes de la disponibilidad de arginina y de la restauración de los niveles de BH_4 (Ozaki *et al.*, 2002).

3.3.3.4 Grupo hemo

En estrecha relación con la tetrahydrobiopterina para la estabilización de dímeros activos de NOS, está el grupo hemo.

La importancia del grupo hemo radica en que la producción de óxido nítrico por NOS, requiere la dimerización de la enzima y el sitio activo de dichas enzimas necesita dos grupos hemo. Si bien es cierto que para dimerizar sería suficiente con un solo grupo hemo, pero la catálisis precisa dos (Xie *et al.*, 1996).

De forma esquemática, en la siguiente figura, se puede observar el modelo para la formación del complejo NOS-NO durante la catálisis. En presencia de L-arginina y con exceso de NADPH, el ión férrico (Fe^{3+}) del grupo hemo unido a la NOS, se reduce a ión ferroso (Fe^{2+}) (Wang *et al.*, 1994). La unión del óxido nítrico es más fuerte a la forma reducida (Fe^{2+}), estando a su vez, estabilizada por la presencia de L-arginina en el medio (Porter y Coon, 1991; Wells *et al.*, 1992).

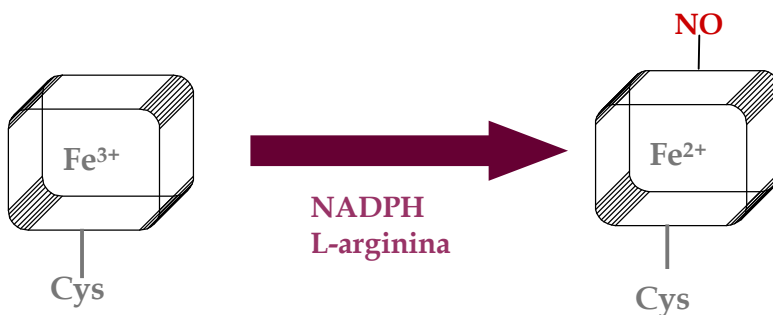


Figura 13. Modelo para la formación del complejo constituido por la L-arginina y el óxido nítrico (NO) durante la etapa catalítica (Original tomado de Wang *et al.*, 1994)

3.3.4 Regulación de las óxido nítrico sintetasas

La expresión de las tres isoformas de NOS está regulada por mecanismos transcripcionales y posttranscripcionales.

Los mecanismos transcripcionales implicados en la regulación de la actividad de las NOS implican a factores de transcripción (NF κ B), al propio NO y a proteínas asociadas a las isoformas (proteína quinasas y proteínas de estrés térmico).

A nivel posttranscripcional, la expresión de las óxido nítrico sintetasas se regula por cambios en la estabilidad del ARNm de cada una de las isoformas (Arnal *et al.*, 1992; Searles *et al.*, 1999). Ciertos estímulos como pueden ser estados de hipoxia, determinadas citoquinas (TNF, LPS) o estrés, provocan una disminución de la vida media del ARNm (Mohamed *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997).

3.3.4.1. Factores de transcripción NF κ B

Los factores de transcripción NF κ B son homo o heterodímeros de proteínas que pertenecen a la familia *Rel* (Verma *et al.*, 1995; Baldwin, 1996). La expresión de estos factores, regula procesos inmunitarios en respuesta al estrés, inflamación (Bauerle y Baltimore, 1996) e incluso regula la inhibición de la apoptosis (Van Antwerp *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996).

Los NF κ B están presentes en la mayoría de las células y tejidos como proteínas inactivas. Son retenidos en el citosol por su interacción con unas proteínas denominadas I κ Bs. La actividad de NF κ B puede ser inducida por un amplio espectro de señales, incluyendo citoquinas, virus, luz ultravioleta, etc (Kopp y Ghosh, 1995). Estos elementos externos promueven la fosforilación, ubiquitinación y degradación de I κ Bs, facilitando la liberación de NF κ B. Es en este

momento, cuando se pueden translocar al núcleo para inducir la transcripción del ARNm de las NOS (Verma *et al.*, 1995; Baldwin, 1996; Bauerle y Baltimore, 1996).

3.3.4.2 Óxido nítrico

La dimerización de los monómeros de NOS es limitada por el propio óxido nítrico sintetizado por las enzimas, actuando a través de un proceso de retroalimentación (*feedback*).

El óxido nítrico actúa de dos formas para regular la actividad de las óxido nítrico sintetasas:

- a. Inhibe directamente la catálisis de las NOS por unión a la forma reducida del grupo hemo unido a la enzima.
- b. Inhibe la unión de dímeros de NOS (Hurshman y Marletta, 1995; Abu-Soud *et al.*, 1995).

El óxido nítrico puede considerarse un limitante intracelular de la formación de dímeros de las NOS inducible y endotelial, que por impedimento de la inserción del grupo hemo (Albakri y Stuehr, 1996), provocaría una acumulación de monómeros de NOS (Weiss *et al.*, 1994).

Albakri y Stuehr (1996), sostienen que el NO regula la expresión de iNOS a dos niveles, el transcripcional y el posttranscripcional. Otros autores, afirman que el NO regulando la actividad de factores de transcripción, actuaría como modulador en el control transcripcional de varios genes (Peng *et al.*, 1995; Zeiher *et al.*, 1995; Hausladen *et al.*, 1996). En estudios recientes, se ha descubierto la capacidad del óxido nítrico sintetizado a partir de eNOS *in vivo*, para facilitar la iniciación y prolongación de la expresión de la isoforma inducible (Connelly *et al.*, 2005). Las modificaciones posttranscripcionales, provocadas por el óxido nítrico

funcionan como un tipo de señalización específica, siendo estas señales utilizadas para combatir la invasión por microbios y células cancerígenas (Stamler *et al.*, 2001).

3.3.4.3 Proteínas asociadas a las óxido nítrico sintetasas

La expresión de las tres isoformas, está determinada por la asociación de diversas proteínas, de modo que cualquier alteración en la localización y asociación de estas proteínas influirá en la actividad de las NOS.

3.3.4.3.1 Proteína quinasas

I. Proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA)

La asociación entre PKA y las isoformas de NOS se considera un mecanismo de regulación debido a la capacidad de la quinasa para fosforilar residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) presentes en las óxido nítrico sintetasas (Butt *et al.*, 2000; Fulton *et al.*, 2002).

De todas las NOS, la regulación mejor conocida es la de esta quinasa sobre la isoforma inducible. La acción de determinadas citoquinas y endotoxinas (Galea y Feinstein, 1999), favorece la síntesis de AMPc y éste a su vez activa la PKA. Esta quinasa puede regular la transcripción del gen que codifica para la iNOS (Kunz *et al.*, 1994; Eberhardt *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999) mostrando a la vez, efectos opuestos en distintos tipos celulares, como adipocitos, células del músculo liso, células endoteliales del cerebro y macrófagos (Galea y Feinstein, 1999).

La PKA también puede modular la expresión de eNOS, de forma similar a como lo hace con la isoforma inducible, aunque la fosforiliación de eNOS

dependiente de la PKA está relacionada con determinados estímulos como el estrés (Boo *et al.*, 2002).

II. Proteína quinasa dependiente de calcio (PKC)

La PKC está implicada en procesos de fosforilación en múltiples cascadas de señalización, además de participar en la regulación de la expresión de iNOS de líneas celulares de macrófagos (Wu *et al.*, 2003) favoreciendo la translocación de los factores de transcripción NFκB al núcleo, lo cual facilita el inicio de la transcripción del ARNm de la iNOS (Xie *et al.*, 1994; Mercurio *et al.*, 1997; Karin, 1999; Tak y Firestein, 2001).

La actividad de la PKC estimulada por estrés puede ser traducida en una señal para la activación o para la inhibición de eNOS, dado que la quinasa fosforila a la eNOS y esta forma fosforilada muestra una menor afinidad por la CaM, reflejándose en una disminución de la actividad de la isoforma (Matsubara *et al.*, 2003).

3.3.4.3.2 Proteínas de estrés térmico (Hsp_s)

Las proteínas de estrés no sólo están presentes en células que se hallan en condiciones ambientales desfavorables, sino que también se sintetizan en condiciones normales (Lindquist y Craig, 1988).

Una proteína de esta familia, la Hsp90, ha sido identificada como una de las proteínas asociadas a las NOS, que participa en los procesos de regulación de estas enzimas. Esta proteína está involucrada en la maduración de diversas enzimas, entre ellas la eNOS (Gratton *et al.*, 2000). Mediante la inserción del grupo hemo en la enzima inmadura (Billecke *et al.*, 2002), lo que produce que se

incremente la afinidad de las isoformas constitutivas (cNOS) por la calmodulina (CaM) (Song *et al.*, 2001).

En células endoteliales sometidas a cualquier tipo de estrés, la Hsp90 es reclutada rápidamente por la eNOS. A su vez, esta unión entre Hsp90 y eNOS, favorece el aumento de la fosforilación de la isoforma endotelial por una serina/treonina quinasa (Akt), lo cual se refleja en un incremento en la producción de NO (García-Cardena *et al.*, 1998; Gallis *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 1999; Haynes *et al.*, 2000; Simoncini *et al.*, 2000; Brouet *et al.*, 2001; Hisamoto *et al.*, 2001; Takahashi y Mendelsohn, 2003).

4. Transmisión de señales en la respuesta inmune

4.1 Proteína quinasas

Las proteína quinasas son una familia de enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato (Pi) desde un nucleósido trifosfato (normalmente el adenosín-trifosfato o ATP) a un grupo hidroxilo aceptor en una proteína sustrato (Krebs, 1986; Hunter, 1991; Hunter y Sefton, 1991; Inagaki *et al.*, 1994).

4.1.1 PKA

La proteína quinasa dependiente de adenosín-monofosfato cíclico (PKA) (E. C. 2.7.1.37), posee una simplicidad funcional que la convierte en el prototipo para el estudio de la familia de las quinasas. Se sabe que en estado inactivo (Figura 14), la enzima es un tetrámero formado por dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C); aceptándose de forma generalizada la presencia citosólica de PKA (Taylor *et al.*, 1990; Scott, 1991; Francis y Corbin, 1994).

El AMPc es uno de los mediadores en la conversión de señales extracelulares hacia sucesos intracelulares (Montminy, 1997; Daniel, 1998). La unión de ligandos a los receptores asociados a proteínas G, activa la adenilato ciclasa, que convierte ATP en AMP_c (Iyengar, 1993).

La unión de AMPc a las subunidades reguladoras (en los dominios de unión A y B) promueve la disociación de la holoenzima en un dímero de subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas monoméricas y activas que pueden fosforilar restos de serina y/o treonina de una gran cantidad de proteínas, dependiendo del tipo celular y de su estado de diferenciación. A pesar de la gran diversidad existente entre los sustratos de la PKA, todos contienen una secuencia consenso mínima reconocida por esta proteína quinasa (Tegge *et al.*, 1995)

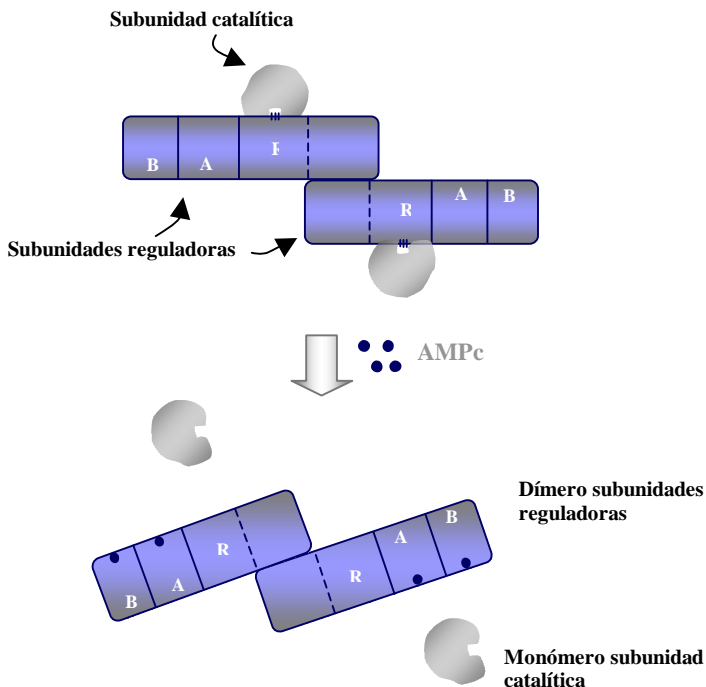


Figura 14. Esquema de la estructura molecular de la PKA. A, B: dominios de unión para el AMPc; R: dominio de interacción con la subunidad catalítica.

La subunidad catalítica presenta capacidad para fosforilar un amplio rango de proteínas, incluyendo a receptores de membrana, proteínas del citoesqueleto, quinasas, fosfatasas y otras enzimas (Meinkoth *et al.*, 1990; Harootunian *et al.*, 1993; Bacskai *et al.*, 1993; Habener, 1995). A su vez, la disociación de la holoenzima favorece que la subunidad catalítica migre al interior del núcleo celular (Nigg *et al.*, 1985), donde fosforila y activa algunos de los factores de transcripción relacionados con las CaM quinasas (CaMK) (Montminy, 1997).

4.1.1.1 PKA en *Mytilus galloprovincialis* Lmk.

En el caso concreto de *M. galloprovincialis* Lmk., se ha caracterizado dos isoformas de PKA, cada una de ellas está constituida por dos tipos de subunidades (catalítica y reguladora) al igual que ocurre con su homóloga de mamíferos.

La subunidad catalítica de la PKA de mejillón, muestra unas propiedades físicas y cinéticas, así como un mecanismo de regulación, esencialmente idénticos a los descritos para la proteína homóloga de mamíferos. Esto sugiere un elevado grado de conservación estructural entre ambas quinasas, a pesar de las diferencias establecidas en la escala evolutiva.

En extractos de manto de mejillón, han sido identificadas tres proteínas que unían específicamente AMPc. Sin embargo, de estas tres proteínas, solo una de ellas (54 kDa) fue capaz de reasociarse con la subunidad catalítica de la PKA, inhibiendo su actividad quinasa en ausencia de AMPc, lo cual indica que únicamente esta proteína puede actuar como subunidad reguladora de la proteína quinasa A. Las otras dos proteínas capaces de unirse al AMPc, pero incapaces de regular la subunidad catalítica de PKA, probablemente sean fragmentos proteolíticos procedentes de la subunidad reguladora (Cao *et al.*, 1995; 1996).

En *Mytilus galloprovincialis* han sido identificadas dos subunidades reguladoras, R_{myt1} y R_{myt2}, las cuales son homólogas a las subunidades reguladoras RI y RII de mamíferos. Estas subunidades poseen el mismo peso molecular, aunque han sido purificadas a partir de diferentes tejidos de mejillón, obteniéndose R_{myt1} a partir de músculo aductor posterior (PAM) y R_{myt2} a partir de manto (Díaz-Enrich *et al.*, 2003; Bardales *et al.*, 2004).

4.1.2 PKC

La PKC es reconocida como una familia de serina/treonina quinasas que utilizan el γ -fosfato de ATP, o GTP en menor grado, para generar fosfomonoésteres utilizando como fosfoacepores los grupos alcohol en serina y treonina y/o el grupo fenólico en tirosina (Hanks y Hunter, 1995). Esta quinasa, se ha reconocido como receptor celular para el diacilglicerol (DAG), capaz de fosforilar una amplia variedad de sustratos celulares, siendo su papel clave en mecanismos de transducción de señales, involucrados en la activación de receptores acoplados a fosfolipasas (Chauhan *et al.*, 1990; Khan *et al.*, 1995; Ron y Kazanietz, 1999).

Al menos once isoenzimas de PKC han sido identificadas y se han clasificado en tres grupos, atendiendo a su estructura y a los cofactores implicados en su activación (Azzi *et al.*, 1992; Nishizuka, 1995; Kanashiro y Khalil, 1998).

- PKCs clásicas (cPKCs). Es el grupo mejor conocido y corresponde al primero que fue descrito. Son dependientes de Ca^{2+} , DAG y activadas por fosfatidil L-serina (PS); *in vitro* son sensibles a ésteres de forbol como por ejemplo el 12-miristoato 13-acetato o PMA (Castagna *et al.*, 1982; Ono *et al.*, 1989).

- PKCs nuevas (nPKCs). Son independientes de Ca^{2+} (Schaap *et al.*, 1989; Leibersperguer *et al.*, 1991; Osada *et al.*, 1992), pero son activadas por DAG y por PS, además de ser sensibles a PMA (Zhang *et al.*, 1995).
- PKCs atípicas (aPKCs). Son sólo dependientes de PS, insensibles a DAG, Ca^{2+} y PMA (Coghlan *et al.*, 2000).

4.1.2.1 Estructura molecular de la PKC

La PKC es un polipéptido simple en el que se distinguen dos dominios, un dominio regulador (región amino terminal) y un dominio catalítico (región carboxilo terminal). El dominio regulador posee secuencias aminoacídicas involucradas en la unión de cofactores: lípidos y calcio. Participa en interacciones proteína-proteína que regulan la localización y actividad de esta quinasa. El dominio catalítico posee actividad quinasa y presenta regiones involucradas en la unión de ATP y del sustrato (Azzi *et al.*, 1992; Ron y Kazanietz, 1999) (Figura 15). El clonaje de las primeras isoenzimas, reveló la presencia de cuatro dominios conservados (C1-C4) y cinco dominios variables (V1-V5) (Coussens *et al.*, 1986). Los dominios C1 y C2 forman parte de la región reguladora, siendo C1 rico en los residuos de cisteína (Cys), éste aparece duplicado en la mayoría de las isoenzimas (Klevit, 1991). A cada una de estas regiones están unidos dos átomos de Zn^{2+} . Lo que proporciona una estequiometría de cuatro Zn^{2+} por molécula de PKC (Quest *et al.*, 1992). Los dominios están plegados como si de una estructura globular se tratase, surcada por dos láminas β plegadas, a las que, *in vitro*, se unen el DAG y ésteres de forbol (Ono *et al.*, 1989; Hommel *et al.*, 1994).

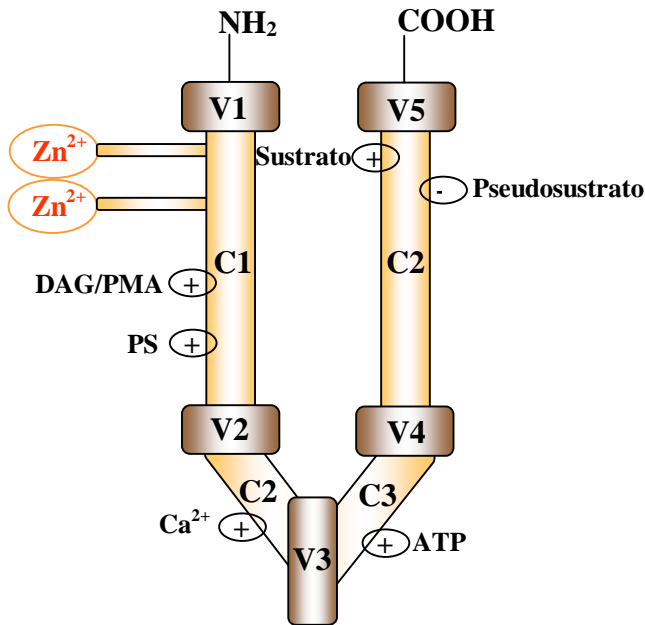


Figura 15. Esquema de la estructura molecular de PKC. C1-C4: dominios conservados; V1-V5: dominios variables (Original tomado de Kanashiro y Khalil, 1998)

4.1.2.2 Fosforilación de la PKC

En general, las PKCs son sintetizadas como proteínas catalíticamente inactivas, que se convierten en enzimas activas a través de un proceso secuencial de adición de fosfatos (Chow *et al.*, 1998; Dutil *et al.*, 1998; Le Good *et al.*, 1998; Behn-Krappa y Newton, 1999; Dutil y Newton, 2000), en el cual pueden estar involucrados determinados cambios conformacionales (Johnson y Barford, 1993). La conservación de residuos ácidos en las distintas isoformas, indica la importancia de la fosforilación en la regulación de esta familia de PKCs (Dutil *et al.*, 1998). Aunque estas proteína quinasas están sujetas a procesos de autofosforilación, también pueden ser sustratos de otras quinasas e incluso de otras isoformas de PKC (Ron y Kazanietz, 1999).

4.1.2.3 Translocación de la PKC

La PKC ha sido localizada en la fracción citosólica de las células y la activación de esta quinasa está asociada a una redistribución de la enzima desde el citosol hacia ambientes más hidrofóbicos como puede ser la membrana plasmática (Kraft y Anderson, 1983; Kanashiro y Khalil, 1998). La unión de Ca^{2+} y DAG a esta quinasa en presencia de fosfatidil L-serina (PS), provoca un cambio conformacional en la PKC, incrementándose de esta forma, su hidrofobicidad (Kanashiro y Khalil, 1998). La dinámica del movimiento de la quinasa a la membrana plasmática, en respuesta a la activación de receptores de superficie celular, ocurre en tres pasos: la translocación a la membrana, el anclaje y la disociación. Se sabe que estos procesos son regulados por autofosforilaciones, aunque la quinasa se fosforile en el citosol, necesita de varias fosforilaciones para alcanzar la membrana, aún en presencia de calcio. Las fosforilaciones inciden en el aumento de la afinidad por DAG y PS. Finalmente, una vez cesada la estimulación sobre el receptor de superficie, se produce la disociación de la PKC, por un descenso de los niveles de DAG y Ca^{2+} , que inducen una autofosforilación de los dominios reguladores (Xiao *et al.*, 2000).

Se ha descrito la capacidad de la PKC para translocarse al núcleo, cuando las células son estimuladas con ésteres de forbol, como por ejemplo, forbol 12-miristoato 13-acetato (PMA) (Hocevar *et al.*, 1993; Goss *et al.*, 1994) que es un potente promotor tumoral (Yeung y Hurta, 2001). Se puede decir que DAG y PMA, son homólogos fisiológicamente y pueden unirse al mismo sitio, concretamente al dominio C1 de la quinasa (Sharkey, 1984; Kazanietz, 2000; Brose y Rosenmund, 2002; Kazanietz, 2002); de forma que los ésteres de forbol pueden desempeñar la misma función que el DAG y activar tanto *in vivo* como *in vitro* a la PKC (Castagna *et al.*, 1982; Sano *et al.*, 1983; Yamanishi *et al.*, 1983; Yeung y Hurta, 2001). Los ésteres de forbol aumentan la afinidad de la PKC por el

Ca^{2+} y a diferencia del DAG, el PMA obliga a la enzima a permanecer en la membrana plasmática, favoreciendo el desarrollo de procesos cancerígenos (Buchner *et al.*, 1992; Kazanietz *et al.*, 2001).

4.1.2.4 PKC en *Mytilus galloprovincialis* Lmk.

En el caso de *Mytilus galloprovincialis* Lmk., ha sido identificada una proteína de 105 kDa (*p105*) que presenta actividad quinasa dependiente de fosfatidil L-serina y PMA e independiente de Ca^{2+} . Se comprobó que la *p105*, estaba presente en manto, branquias, pie, músculo aductor posterior, hepatopráncreas y hemocitos de *M. galloprovincialis*. *In vitro*, la proteína *p105* es capaz de autofosforilarse sin la presencia de cofactores lipídicos (Mercado *et al.*, 2002a; 2002b). A su vez, los parámetros cinéticos de esta proteína, la asemejan a una isoforma nPKC de mamíferos.

Mediante análisis con microscopía confocal, se detectó que *p105* tenía una distribución citoplasmática homogénea y que no estaba presente en el núcleo (Figura16). Debido al conocimiento de la susceptibilidad que presentan las isoformas de PKC frente a la estimulación con ésteres de forbol, se estudió el comportamiento de la enzima (*p105*) en cultivos de hemocitos expuestos a un tipo de forbol, concretamente el PMA. En la figura 16, se aprecia la translocación que sufre *p105* a la membrana cuando las poblaciones de hemocitos son expuestos a PMA (Mercado *et al.*, 2003).

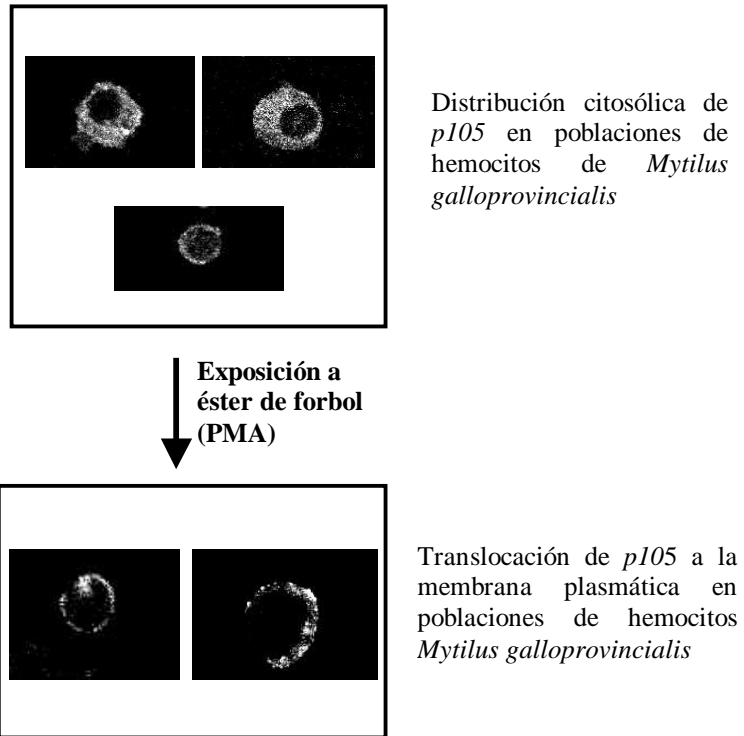


Figura 16. Distribución citosólica y translocación de *p105* en poblaciones de hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* (Mercado *et al.*, 2003)

5. Apoptosis o muerte celular programada

La apoptosis (Kerr *et al.*, 1972) es un mecanismo fisiológico de muerte celular, que ha sido conservado evolutivamente desde nematodos hasta mamíferos (Vaux y Strasser, 1996). Con este proceso específico se pueden eliminar células de tejidos normales, siendo considerado un mecanismo importante para la proliferación celular, desarrollo embrionario (Arends y Wyllie, 1991; Ellis *et al.*, 1991; Cohen *et al.*, 1994), desarrollo nervioso (Raff *et al.*, 1993), defensa

inmunitaria (Golstein *et al.*, 1991; Williams, 1991) y envejecimiento (Kennedy *et al.*, 1995; Vaux y Strasser, 1996). Se cree que la supresión de la apoptosis, puede contribuir al desarrollo inicial de cáncer y de la aparición de células tumorales resistentes a la terapia citotóxica (Williams, 1991; Hale *et al.*, 1996).

5.1 Fases de la apoptosis

Algunos autores dividen la apoptosis en cuatro fases: temprana, de detección, efectora y postmorten:

1. **Fase temprana:** Esta fase está constituida por el estímulo que provoca una respuesta apoptótica. Este estímulo puede ser una señal externa en receptores de superficie o puede originarse en el interior de la propia célula como respuesta a la acción de toxinas, radiación o drogas.
2. **Fase de detección:** Esta es la fase que incluye la detección y transducción de la señal por el metabolismo. La ruta o rutas de transducción de señales activan los procesos necesarios para iniciar la muerte celular.
3. **Fase efectora:** La tercera fase de este mecanismo celular incluye la acción de las proteasas, y sus moduladores que las regulan positiva y negativamente.
4. **Fase postmorten:** En esta última fase se produce la condensación de la cromatina y la degradación del ADN. *In vivo*, pero no necesariamente *in vitro*, las células apoptóticas son reorganizadas y englobadas por células adyacentes (Ellis *et al.*, 1991).

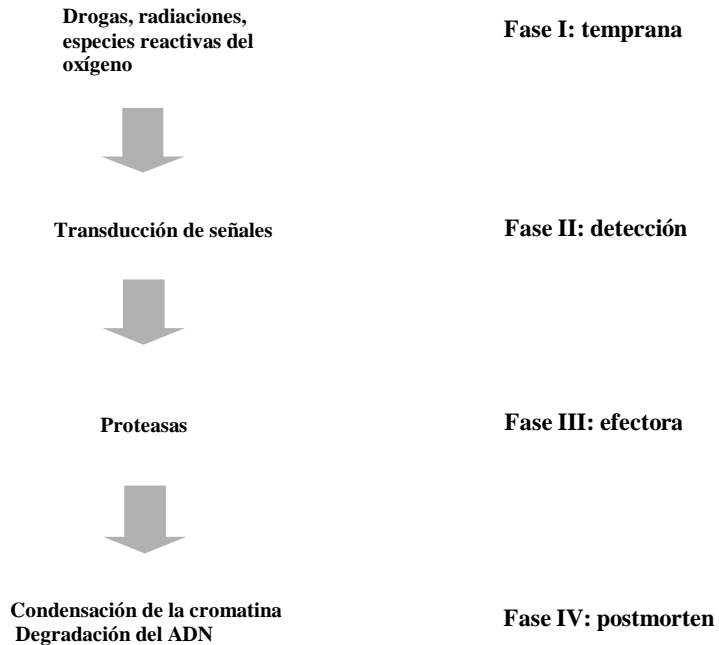


Figura 17. Modelo de apoptosis en células de mamíferos

Sin embargo, otros autores reagrupan estas cuatro fases, sólo en dos. Considerando las fases principales aquellas en las que se producen cambios morfológicos extremos en la estructura celular como condensación y fragmentación de cromatina nuclear, compactación de orgánulos citoplasmáticos, dilatación del retículo endoplasmático, descenso del volumen celular y alteraciones de la membrana plasmática. Toda esta primera fase concluiría en una segunda, que consiste en la reorganización y fagocitosis de células apoptóticas, previniendo una posible respuesta inflamatoria (Arends y Wyllie, 1991; Jacobson *et al.*, 1994; Takahashi y Earnshaw, 1996). Todas estas alteraciones nucleares están asociadas a la escisión internucleosomal del ADN, lo que ópticamente se observa como *ADN en escalera*. Cada uno de los fragmentos de esa *escalera*, están constituidos por 200-300 pb (Oberhammer *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 1994).

5.2 Regulación de la apoptosis

Las condiciones que desencadenan la apoptosis son variadas y variables. El polimorfismo existente en la ruta de activación de la muerte *celular programada*, se puede relacionar con un control intracelular, que puede variar significativamente según sea la función y el estado celular, así como los mecanismos inductores de la apoptosis (Golstein *et al.*, 1991).

Una célula sufrirá apoptosis como resultado de la información recibida de su ambiente. La interpretación de dicha señal dependerá de ciertas variables como el tipo, desarrollo y estado de maduración celular (Williams y Smith, 1993). Desde un estímulo externo, una parte de la información decidirá entre la supervivencia y la destrucción de la célula. De forma similar, los mecanismos que controlan la apoptosis, actúan siempre a través de un sistema de transducción que está involucrado en la estimulación de receptores de superficie, activación de proteína quinasas y fosfatasa, así como en la liberación de segundos mensajeros para regular (positiva y negativamente) la transcripción de genes específicos (Hale *et al.*, 1996).

5.2.1 Óxido nítrico

El óxido nítrico puede participar en la inducción de la muerte programada en macrófagos (Mills, 1991; Dimmeler y Zeiher, 1997), células tumorales (Cui *et al.*, 1994; Kwon *et al.*, 2004) y timocitos (Tai *et al.*, 1997), aunque, el NO puede prevenir la apoptosis en células B (Genaro *et al.*, 1995). La razón, por la cual se cree que el óxido nítrico es capaz de exhibir dualidad en la regulación de la muerte programada mediante efectos pro-apoptóticos y anti-apoptóticos, se debe a su concentración. La NOS inducible es capaz de sintetizar elevadas concentraciones de óxido nítrico en respuesta a estímulos externos, de forma que este NO pueda

actuar en múltiples procesos inflamatorios con un efecto pro-apoptótico. En cambio, las isoformas constitutivas, sintetizan mínimas concentraciones de óxido nítrico, las cuales podrían ser insuficientes para inducir apoptosis (Dimmeler y Zeiher, 1997).

En el caso de linfocitos B (Hale *et al.*, 1996) y de hepatocitos de mamíferos (Dimmeler *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1997; Saavedra *et al.*, 1997) (Figura 18) se ha observado que al liberarse óxido nítrico, se previene el descenso de la expresión de *bcl-2* en procesos apoptóticos inducidos por antígenos.

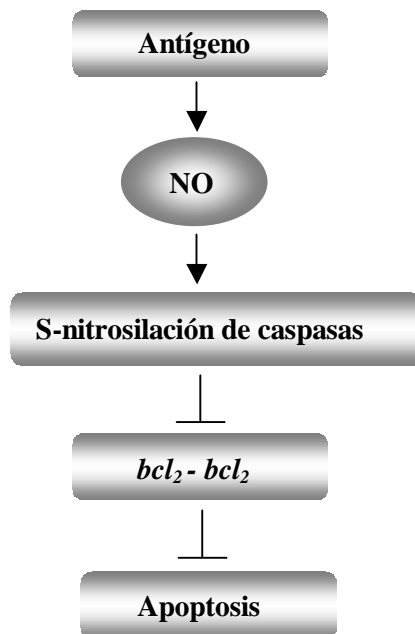


Figura 18. Esquema de la regulación de la apoptosis mediante la acción del óxido nítrico en linfocitos B y en hepatocitos.

Es conocida también la propiedad que posee el NO para bloquear la escisión de *bcl-2* a través de la limitación de la actividad de las caspasas en algunos tipos celulares. Esta limitación de la actividad, está relacionada con la capacidad

del NO para intervenir en el proceso de S-nitrosilación de la cisteína del sitio activo presente en caspasas (Li *et al.*, 1997).

5.2.2 Citoquinas

Las citoquinas presentan capacidad para estimular la proliferación y diferenciación de distintos tipos celulares, así como para regular la inflamación de origen inmunitario, estrés y otras múltiples acciones, como por ejemplo, la apoptosis (Arai *et al.*, 1990).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es una citoquina proinflamatoria que participa en diversos procesos celulares, como proliferación y diferenciación celular, inducción de otras citoquinas, necrosis y apoptosis (Rothe *et al.*, 1992; Tracey y Cerami, 1993; Smith *et al.*, 1994; Liu y Han, 2001). El TNF induce apoptosis, principalmente por implicación en la expresión de proteínas antiapoptóticas (Hughes *et al.*, 2005)

Las células que han sufrido algún tratamiento con TNF, responden o bien activando las MAP quinasas (MAPK) y factores de transcripción (NF κ B), que desarrollan un importante papel en la inducción de un gran número de citoquinas y proteínas implicadas en la regulación de la respuesta inmune (Baeuerle y Baltimore, 1996; Liu y Han, 2001; Pearce y Humphrey, 2001), o mediante la inducción de la apoptosis o necrosis. Los NF κ B presentan una dualidad en este aspecto, dado que se conoce su capacidad tanto para promover como para inhibir procesos apoptóticos (Boland, 2001).

El factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β 1) es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis entre crecimiento celular y apoptosis. El balance entre proliferación celular, supervivencia y muerte celular es uno de los principales procesos fisiológicos en los que este factor está implicado (Gupta, 2000).

El TGF- β 1 presenta una doble respuesta en los procesos apoptóticos variando su acción según el tipo celular. Se ha observado una respuesta pro-apoptótica en hepatocitos (Oberhammer *et al.*, 1992; Shima *et al.*, 1999), células multipotentes hematopoyéticas (Francis *et al.*, 2000), linfocitos B y T (Chaouchi *et al.*, 1995; Lomo *et al.*, 1995; Douglas *et al.*, 1997), mientras que la acción pre-apoptótica ha sido observada en microglía (Schlapbach *et al.*, 2000) y osteoblastos (Sowa *et al.*, 2003).

5.2.3 Receptores de superficie

Una familia de receptores de superficie celular capaces de regular la apoptosis, son los miembros de la familia Fas/TNFR1 (receptores de TNF- α de tipo 1) (Itoh *et al.*, 1993; Tartaglia *et al.*, 1993; Nagata y Golstein, 1995). Los miembros de la familia de TNFR desarrollan una función pleiotrópica. Esto es, dependiendo del tipo celular así como de las señales recibidas de otras células, estos receptores desempeñan acciones tan diversas como proliferación, supervivencia, diferenciación o muerte celular (Nagata, 1997; Ashkenazi y Dixit, 1998; Wallach *et al.*, 1998).

Se ha observado que Fas/TNFR, poseen una región citoplasmática, aparentemente involucrada en la inducción de la muerte celular. Se cree que esta región es tan importante para la activación de la apoptosis, que incluso ha sido denominada como *death domain* o dominio de muerte (DD) (Hale *et al.*, 1996; Nagata, 1997). Además esta región, presenta similitudes con la proteína Reaper (White *et al.*, 1994) cuya funcionalidad en *Drosophila* determina la apoptosis (Golstein *et al.*, 1995).

En la figura 19, se observa como la asociación del TNF- α a uno de sus receptores de superficie, TNFR1, conduce al reclutamiento de proteínas asociadas a este receptor, TRADD (receptor de TNF asociado al dominio de muerte) hacia el

interior del complejo (Hsu *et al.*, 1995). A su vez, TRADD es capaz de interactuar con otras proteínas efectoras como FADD (Fas asociado con dominio de muerte), TRAF2 (receptor de TNF activado por el factor tipo 2) y *Rip* (Rothe *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1996a, 1996b). Éstos últimos poseen capacidad para activar diversos factores de transcripción, entre ellos los NF κ B y las MAP quinasas (MAPK), concretamente ERK y JNK (Smith *et al.*, 1994; Liu y Han, 2001; Pearce y Humphrey, 2001).

Los NF κ B están inactivos en la mayoría de las células, ya que se encuentran retenidos en el citoplasma por unas proteínas inhibitoras (I κ Bs). En respuesta al tratamiento con TNF- α , las IKKs, constituidas por dos subunidades (IKK α e IKK β), se asocian con el complejo de receptores a través de TRAF2. Para que se produzca su activación, es necesario que interactúe la subunidad reguladora de las IKKs (IKK β) con *Rip* (Liu, 2005). De esta forma, las IKKs promueven procesos de fosforilación y ubiquitinación de las I κ Bs, facilitando así su rápida degradación y permitiendo la translocación de los NF κ B al núcleo para activar determinados genes (Mayo y Baldwin, 2000). La existencia de estudios realizados con ratones deficientes en *Rip* y TRAF2, corroboran la importancia de estos receptores en la inducción de la apoptosis. Se ha observado que las señales iniciadas por el TNF- α promueven la supervivencia celular más que la apoptosis, debido a las rutas anti-apoptóticas desarrolladas por Jun y NF κ B (Lee *et al.*, 1997; Kelliher *et al.*, 1998; Strasser *et al.*, 2000).

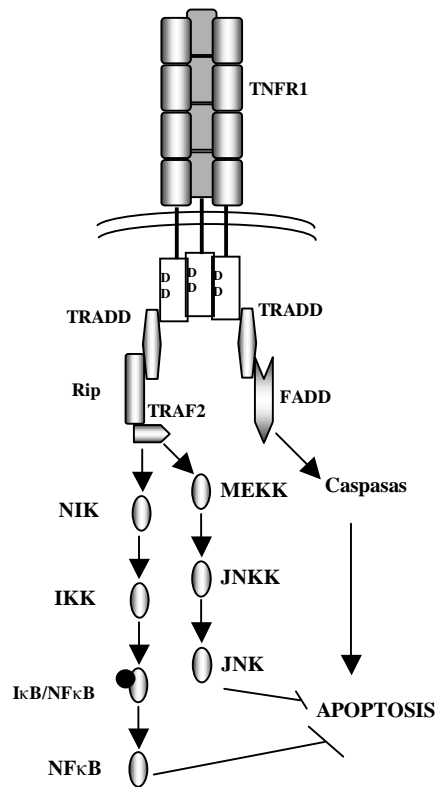


Figura 19. Rutas de transducción de señales inducidas por el receptor de tipo 1 del TNF- α (TNFR1) al interactuar con TNF- α

En el caso del TGF- β_1 (Figura 20) se han descrito al menos tres clases diferentes de receptores de la familia de este factor de crecimiento, abreviados como T β RI, T β RII y T β RIII. Éste último es el más abundante de los tres y actúa uniendo TGF- β_1 y transfiriendo la citoquina a los de tipo I y II. Los receptores de tipo I y tipo II poseen actividad serina-treonina quinasa en su dominio citoplasmático y para ser activos tienen que formar heterodímeros. A su vez, el receptor de tipo II posee actividad serina – treonina quinasa constitutiva, no modulada por la unión a su ligando. Sin embargo, la unión del TGF- β_1 al receptor

II es reconocida por el receptor I, uniéndose a él para formar un complejo. El receptor I es fosforilado por el II y esta fosforilación activa la proteína quinasa del receptor I, lo que conduce a la fosforilación de diversos factores de transcripción Smad, resultando en una translocación de estos factores al núcleo para intervenir en la expresión génica (Frabegat y Fernández, 2002). Sin embargo, existen Smad, denominadas Smad inhibidoras (I-Smad) que regulan negativamente la señalización desde los receptores serina – treonina quinasa (Masagué y Chen, 2000; Masagué y Wotton, 2000).

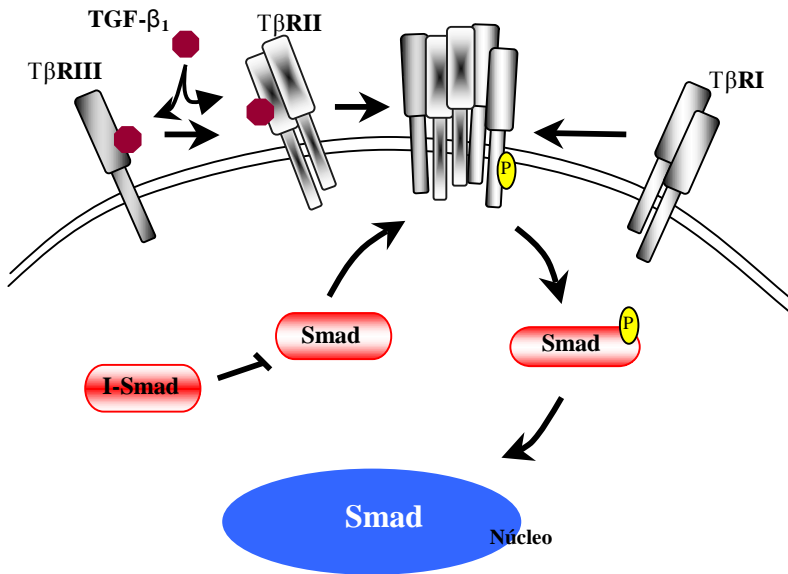


Figura 20. Rutas de transducción de señales inducidas por los receptores TβRI, TβRII y TβRIII al interactuar con el TGF-β₁

En estrecha relación con los receptores de superficie se encuentran determinadas tirosina quinasa (PTKs) y serina/treonina quinasa (Akt y PKC).

Las PTKs están implicadas en la transmisión de señales desde receptores de superficie hasta el núcleo. Al movilizar tirosina quinasa hacia el dominio

intracelular del receptor se puede activar la cascada de fosforilación, involucrando a otras familias de quinasas (Jak o Src) en las rutas de señalización inducidas por citoquinas para controlar la apoptosis (Ziemiecki *et al.*, 1994; Yousefi *al.*, 1994). A su vez, los receptores de superficie a través de proteínas G y PTKs, están acoplados a rutas de señalización dependientes de calcio. Para ello, se activa la fosfolipasa C (PLC), que está implicada en la hidrólisis del fosfatidilinositol 4, 5-bisfosfato (PIP₂), originando dos segundos mensajeros: inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El inositol facilita la liberación de Ca²⁺ desde el retículo endoplasmático, creándose un flujo de calcio a través de la membrana plasmática (Berridge e Irvine 1984; Smith *et al.*, 1989); mientras que el DAG activa a la PKC (Smith *et al.*, 1989). La ruta de señalización de la PKC puede interconectarse con muchas otras rutas de transducción de señales y estas interacciones entre rutas de señalización, podrían, aparentemente, explicar la implicación de la PKC en procesos de proliferación y de apoptosis (Hale *et al.*, 1996) (Figura 21).

En el caso de la serina/treonina quinasa Akt, la estimulación por factores de crecimiento y citoquinas a través de TNFR1, provoca la translocación de esta quinasa desde el citosol hasta la membrana plasmática. Desde allí puede ser fosforilada por la PDK1 (Stokoe *et al.*, 1997; Stephens *et al.*, 1998; Balendran *et al.*, 1999), mientras que la fosforilación de esta quinasa en el citosol se debe a la PI(3)K (Franke *et al.*, 1997). A su vez, Akt puede fosforilar la subunidad α de las IKKs, las cuales están implicadas en la liberación de los factores de transcripción NF κ B (Ozes *et al.*, 1999; Romashkova y Makarov, 1999) (Figura 21).

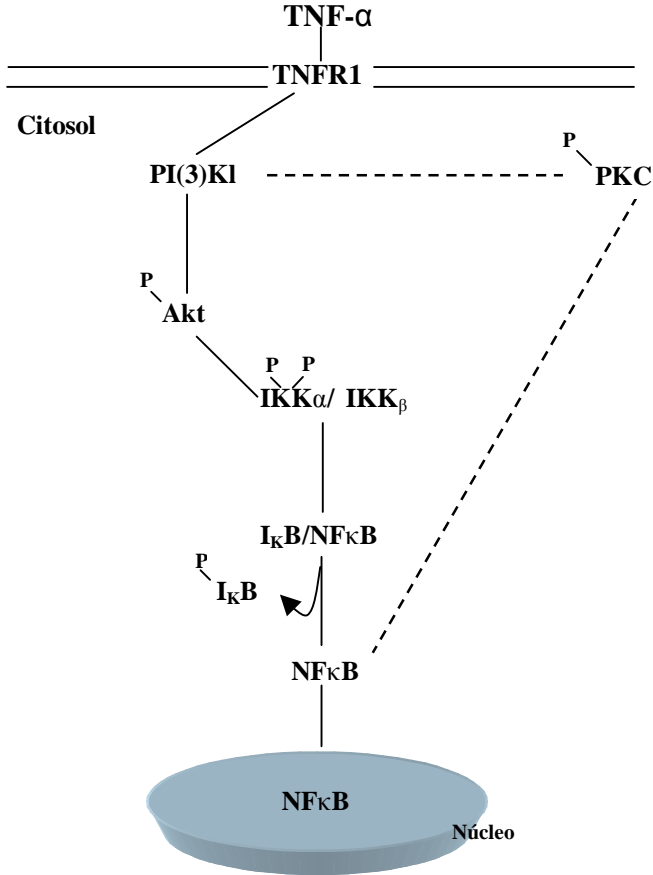


Figura 21. Transducción de señales a través de Akt inducidas por la interacción de TNF- α con TNFR1

El cultivo de mejillón en Galicia comenzó en el año 1945 y se expandió de una manera sorprendente durante años posteriores. Sin embargo, este incremento en la producción no fue debido a un mayor conocimiento científico de la biología del animal, sino que la mayor parte de las técnicas de cultivo se elaboraron sobre bases empíricas (Barcia *et al.*, 1992). De la misma forma, el estudio de enfermedades que puedan afectar a los moluscos, se ha visto retardado en el tiempo entre otras causas por la carencia de sistemas de cultivo de células apropiados.

La investigación de los mecanismos de defensa del mejillón, cobra un importante interés debido a su prolífica distribución, a su trascendencia en la acuicultura y en su empleo como modelo en estudios de contaminación ambiental (Shelton *et al.*, 1999).

De forma que el principal objetivo de este trabajo fue **el estudio de la influencia del lipopolisacárido (LPS) y algunas citoquinas (TNF- α , IL-2, PDGF y TGF- β 1) en la respuesta inmune de *Mytilus galloprovincialis* Lmk.**

Para poder alcanzar dicho objetivo, fue preciso establecer varios sub-objetivos:

1. Adaptación de un medio de cultivo compatible con el método empleado para la cuantificación de óxido nítrico liberado por hemocitos de *Mytilus galloprovincialis*.
2. Estudio de la respuesta de hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* mediante:

- 2.1 La cuantificación de la producción de óxido nítrico (NO) y la expresión proteica en hemocitos incubados con LPS, TNF- α , IL-2, PDGF y TGF- β_1 .
 - 2.2 El análisis de la implicación de PKA y de PKC en las rutas de señalización relacionadas con la síntesis de NO en hemocitos.
 - 2.3 Detección de la enzima responsable de la producción de NO.
3. Estudio de la posible variación estacional en la respuesta de los hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* al ser incubados con LPS, IL-2, TNF- α , PDGF y TGF- β_1 .
 4. Inducción de apoptosis en hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* mediante el empleo de LPS, TNF- α , IL-2, PDGF, TGF- β_1 y CHX.

1. Material biológico

Se utilizaron mejillones de la especie *Mytilus galloprovincialis* Lmk.

Los moluscos fueron recogidos en una planta depuradora localizada en la ría de Betanzos (A Coruña).

2. Reactivos

Para la preparación de las disoluciones y tampones se usaron reactivos de las casas: E. Merck (Darmstad, Alemania); Sigma Chemical CO. (St. Louis, U.S.A.); Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania); Montplet & Esteban, Probus, Vorquímica (España). En todos los casos, fueron reactivos de grado analítico.

El medio de cultivo Leibovitz L-15 sin L-glutamina se obtuvo de la firma Biochrom KG, Berlín.

Las electroforesis de poliacrilamida y de agarosa se realizaron con reactivos y aparatos de la firma Bio – Rad (Richmond, USA).

La membrana Immobilon™-P (PVDF) empleada para transferencia de proteínas y los filtros Millex estériles 0,45 µm y Steriavac TM-GP10 0,22 µm se obtuvieron de la firma Millipore (Bedford, MA, USA).

El kit ECL® para la detección por quimioluminiscencia empleados en el western-blotting fue proporcionado por Amershan International (Buckinghamshire, Inglaterra).

Los marcadores de peso molecular para las electroforesis de poliacrilamida se obtuvieron de la firma GibcoBRL (Inchinna, Scotland) y Bio –Rad (Richmond, USA).

El anticuerpo monoclonal de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) humana y el anticuerpo monoclonal de la óxido nítrico endotelial (eNOS) bovina,

así como el anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa fueron de la firma Sigma Chemical CO (St. Louis, USA). Los anticuerpos anti-PKC de mejillón fueron sintetizados a partir de ratón en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria (Mercado *et al.*, 2002a).

3. Aparatos

El esterilizador de sólidos empleado fue de la casa Matachana, serie 500; para la manipulación celular y del material en condiciones estériles se utilizó una campana de flujo laminar Telstar AH-100.

Los reactivos fueron pesados con un granatario eléctrico monoplato Sartorius modelo 1409 y una balanza analítica monoplato eléctrica Sartorius modelo 1601.

Las centrifugaciones para el lavado de hemocitos así como para la obtención de lisados celulares se realizaron en centrífugas Centromix, Denver Instrument y BHG- Hermle Z229.

La osmolaridad de las disoluciones se comprobó en un osmómetro de la casa Gonotec, modelo Osmomat 030; la determinación del pH se realizó con un pHmetro Crison modelo micropH2001.

Las valoraciones espectrofotométricas se realizaron con un espectrofotómetro de la marca Phillips modelo PV8720 y con un lector de placas de la marca Bio – Rad, modelo 550.

Los tratamientos térmicos se realizaron en un baño termostatzado Selecta Precistern S.138.

Las incubaciones a 4° C y en movimiento continuo se realizaron en un Mixing Rotor de la casa Renner Gmbtt; Agitador Rotamax 120 Heidolph.

La estabilización de los cultivos de hemocitos se realizó en una estufa de la marca Selecta.

El equipo concentrador centrífugo empleado fue de la marca Savant, modelo AS160 Automatic SpeedVac.

El microscopio binocular utilizado en las observaciones celulares fue de la marca Olympus CX40 y los microscopios invertidos de Olympus CK2 y URA.Technic XDS, modelo 173.

El material fotográfico empleado fue de la firma Kodak (Biomax MS) y Agfa (Curix R2), realizándose el revelado de las placas con un equipo automático de la firma Agfa-Gevaert, modelo Gevomatic 60.

Los capturadores de imagen empleados fueron Versa Doc Imaging System Modelo 2000 y Gel Doc 1000, ambos de la marca Bio – Rad.

En las electroforesis de poliacrilamida y de agarosa, se emplearon fuentes de alimentación PAC 3000, mientras que para secar geles de acrilamida se utilizó un secador de geles modelo 543, todos de la marca Bio-Rad.

4. Procedimientos generales

Todas las manipulaciones de las células se realizaron en condiciones estériles. La esterilización de la solución antiagregante de Alseve (ALS) (Nöel *et al.*, 1993) se hizo por filtración a través de membranas Millipore de 0.22 μm .

5. Extracción de hemolinfa y obtención de hemocitos

Se limaron las valvas del mejillón de forma que se permitiese la entrada de una aguja directamente hasta el músculo aductor posterior (Figura 22). La hemolinfa fue obtenida de forma estéril y diluida 1:1 (v/v) en tampón ALS (Barcia *et al.*, 1999). Esta operación se repitió el número de veces necesario hasta extraer el volumen máximo posible de hemolinfa. El recuento de dichas células se realizó en una cámara de Neubauer empleando Trypan Blue como colorante vital.



Figura 22. Extracción de hemolinfa en *Mytilus galloprovincialis* Lmk.

6. Cultivo de hemocitos de mejillón

La hemolinfa extraída fue centrifugada durante 10 min a 450 x g, recogiendo el precipitado para ser tratado con ALS (Nöel *et al.*, 1993) y eliminar posibles impurezas de las muestras. Se repitió el procedimiento una ocasión más, eliminándose el sobrenadante. Posteriormente, se añadió 1 ml de medio Leibovitz L-15 suplementado por cada 5×10^5 hemocitos. Para lograr la estabilización de las células se mantuvieron durante 3 días a una temperatura constante de 20°C (Cao *et al.*, 2003).

7. Tampones y soluciones

Los tampones y las soluciones empleados para la realización de esta memoria fueron las siguientes:

7.1 Tampón Alseve (ALS) (pH 7,0; Osmolaridad 1000 mOs) (Nöel *et al.*, 1993)

Glucosa 20,8 g/l
Citrato sódico 8 g/l
EDTA 3,36 g/l
Cloruro sódico 22,5 g/l

7.2 Inactivación del suero fetal bovino (FCS)

El FCS utilizado para suplementar el medio Leibovitz-L15 fue previamente inactivado, para ello, en primer lugar el FCS se dejó 30 min a temperatura ambiente, se descongeló a 37°C, para después llevarlo a 55°C y se dejó a esa temperatura durante 1 hora más, para luego ser congeladas las alícuotas.

7.3 ALS suplementado (pH 7,0; Osmolaridad 1000 mOs)

Al tampón Alseve (ALS), se le añadieron:

Arginina 17,4 g/ml
Glutamina 29,22 µg/ml
Suero bovino fetal (FCS) 10%
Penicilina G 100 100 unidades/ml
Estreptomina 100 µg/ml
Gentamicina 40 mg/ml
Anfotericina 0.1 µg/ml

7.4 Medio de cultivo celular: Leibovitz L-15 suplementado (pH 7,0; Osmolaridad 1000 mOs)

Al medio Leibovitz- 15 comercial sin L-glutamina, se le añadieron:

NaCl 20,2 g/l
KCl 0,54 g/l
CaCl₂.2H₂O 0,6 g/l
MgSO₄.7H₂O 1 g/l
MgCl₂.6 H₂O 3,9 g/l
Glucosa 20,8 g/l
Suero bovino fetal (FCS) 10 %
Penicilina G 100 unidades/ml
Estreptomicina 100 µg/ml
Gentamicina 40 mg/ml
Anfotericina B 0.1 µg/ml
Glutamina 10µl/ml

7.5 Tampón de extracción de proteínas de citosol (pH 7,4)

Hepes 20 mM
EDTA 5 mM
PPi 20 mM
NaF 30 mM
Triton X-100 0,5 %

7.6 Tampón de extracción de proteínas de membrana (pH 6,5)

MES 20 mM
EGTA 10 mM
EDTA 2 mM
Sacarosa 250 mM
 β -mercaptoetanol 10 mM
Glicerol 10 %
Triton X-100 10 %

8. Preparación de lisados de hemocitos

Las suspensiones celulares de hemocitos obtenidos como se han descrito en el apartado 6 fueron lavadas con ALS centrifugándose durante 10 min a 450 x g a temperatura ambiente. Se recogió el precipitado y se añadieron 100 μ l de ALS suplementado por cada 10^6 células. Se incubaron los hemocitos durante un tiempo específico para cada uno de los inductores e inhibidores seleccionados. Transcurrido el tiempo de incubación a una temperatura constante de 20°C se procedió a la centrifugación durante 10 min a 450 x g, recogiendo los hemocitos. A éstos, se les añadieron 100 μ l de tampón de lisis celular y un cóctel de inhibidores de proteasas (PMSF, Benzamidina, Aprotinina, Pepstatina A). A continuación, se mantuvieron durante 30 min a temperatura ambiente con agitación constante. Transcurrido dicho tiempo, se centrifugaron las muestras durante 10 min a 12000 x g a 4°C y se recogió el sobrenadante. Este último se mezcló con tampón de muestra en la proporción 1:4 (v/v). Las muestras tratadas con tampón de muestra se calentaron en un baño a 90°C durante 5 min, fueron enfriadas en hielo de forma inmediata y congeladas hasta su uso.

9. Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)

Se basa en la exposición de la mezcla de proteínas a un campo eléctrico, de forma que las moléculas cargadas migrarán al electrodo de polaridad opuesta. La movilidad de las moléculas dependerá de la viscosidad del medio, del tamaño, de la forma y de la carga de la molécula. La velocidad de desplazamiento electroforético de una partícula dependerá principalmente de los grupos ionizables que existan sobre la superficie, y naturalmente, del signo y magnitud de la carga de dichos grupos. A su vez, estos grupos dependerán de la fuerza iónica y del pH del medio.

El β -mercaptoetanol se utilizó para asegurar la separación de las cadenas proteicas; mientras que el dodecil-sulfato-sódico (SDS) al ser un agente desnaturizante rompe la estructura cuaternaria de las proteínas, separando los monómeros o subunidades que las componen. Cada monómero queda rodeado por una cantidad de moléculas de SDS proporcional a su masa molecular, (aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la proteína). Las moléculas de detergente se disponen alrededor de la proteína con los grupos polares (sulfato) orientados hacia el exterior, de esta forma cada monómero queda rodeado de cargas negativas procedentes de los grupos sulfato. Se consigue así que la proteína migre hacia el ánodo de forma inversamente proporcional a su masa y sin depender de su carga.

La electroforesis se realizó según el método de Laemmli (1970) utilizando placas en las cuales se prepararon dos geles de diferentes concentraciones de acrilamida/bisacrilamida. Dichos geles se prepararon a partir de las siguientes soluciones y tampones:

- **Solución Bis-acrilamida**

Acrilamida: N,N'- Metilenbisacrilamida (se utilizó una mezcla comercial de Bio-Rad 30% Acrilamida/Bis Solución 30:0,8)

- **Tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8**

- **Tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8**

- **Solución de SDS 10%**

- **Solución de Persulfato amónico 10%**

- **Tampón de muestra**

Agua milli-Q® 4,0 ml

Tris-HCl 0,5 M 1,0 ml

Glicerol 0,8 ml

SDS 10 % 1,6 ml

β-mercaptoetanol 0,4 ml

0,05 % bromofenol 0,2 ml

- **Tampón de electroforesis (5X) pH 8.3**

Tris 124 mM

Glicina 960 mM

SDS 17 mM

9.1 Composición de los geles

Gel concentrador (4%)

Agua milli Q [®]	6,1 ml
Tampón Tris-HCl 0,5M pH 6,8	2,5 ml
Acilamida	1,3 ml
SDS 10%	100 µl
Temed	10 µl
Persulfato amónico	50 µl

Gel separador (10%)

Agua milli Q [®]	4,0 ml
Tampón Tris-HCl 1,5M pH 8,8	2,5 ml
Acilamida	3,3 ml
SDS 10%	100 µl
Temed	5 µl
Persulfato amónico	50 µl

El gel concentrador se encuentra en menor proporción que el gel separador y como su propio nombre indica, su función es concentrar las proteínas en un mismo frente. El gel separador se emplea para separar las proteínas de las distintas muestras según su tamaño. La dificultad de desplazamiento que encuentren las

proteínas sometidas a electroforesis depende del tamaño del poro, el cual varía según el porcentaje de acrilamida/bisacrilamida presente en el gel. Se puede decir que a menor porcentaje de acrilamida/bisacrilamida, mayor porosidad del gel y consecuentemente, menor dificultad de desplazamiento de las proteínas.

9.2 Preparación de los geles

Todo el material debe ser limpiado cuidadosamente con alcohol étlico. Una vez montados los cristales de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se depositó la mezcla correspondiente al gel de poliacrilamida de la mayor proporción o gel separador. El depósito se realizó con cuidado para evitar la formación de burbujas. Se añadieron 100 μ l de isopropanol para evitar la formación del menisco. Una vez polimerizado el gel, se retiró el isopropanol y se lavó con agua destilada para eliminar posibles restos de alcohol. Se depositó el gel concentrador. En ese momento, se introdujo el peine entre los cristales para formar los pocillos de muestras y se dejó polimerizar.

Una vez equilibrado el gel, se cargaron las muestras y los marcadores de peso molecular. La carga se ajustó a 15 μ g de proteína por pocillo. Se rellenaron las cubetas con tampón de electroforesis 1X y se conectó la fuente de alimentación de corriente. La electroforesis se realizó durante 60 min con un voltaje de 150 V y a temperatura ambiente. Cuando el marcador de la electroforesis llega a unos 2 mm del final del gel se corta el paso de corriente y se extrae el gel.

9.3 Tinción de los geles con azul Coomasie

Las soluciones utilizadas para la tinción y el desteñido de los geles son las siguientes:

<u>Solución de tinción:</u>		<u>Solución de desteñido:</u>	
Coomasie R-250	10%	Metanol	4%
Metanol	20%	Ácido acético	10%
Ácido acético	7%		

Este método se basa en las interacciones electrostáticas del colorante con los grupos amino de las proteínas en medio ácido. Las proteínas se fijan con ácido acético y metanol a la vez que se produce la tinción. El gel se mantiene en agitación constante durante 30 minutos y posteriormente, se lava el gel durante aproximadamente 3 horas con la solución de desteñido en agitación constante y a temperatura ambiente.

10. *Western-blotting*: Transferencia de proteínas e inmunodetección

10.1 Transferencia de proteínas

Las proteínas presentes en los geles de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de PVDF, previamente tratada con metanol, agua milli Q[®] y tampón de transferencia (Tris-HCl 20 mM, Glicina 150 mM y metanol 20%). A continuación, se sumergió el sandwich con el gel de poliacrilamida y la membrana de

Immobilon™-P (PDVF) en tampón de transferencia y se dejó durante toda la noche a 4°C con una corriente de 30 V o bien durante 3 horas a 60 V. Una vez finalizada la transferencia se bloquearon los lugares no específicos de la membrana mediante incubación con gelatina en polvo al 2,5% diluida en TTBS (Tris-HCl 20 mM, ClNa 0.15 mM, 0.05% Tween 20, pH 7,5) durante 3 horas a temperatura ambiente y con agitación constante.

10.2 Inmunodetección con anti-iNOS, anti-eNOS y anti-*p105*

Una vez bloqueada la membrana, ésta se lavó con TTBS en agitación constante durante 30 seg para a continuación realizar cuatro lavados de 5 min. Después, se incubó la membrana con las correspondientes diluciones en TTBS de los anticuerpos: anti-iNOS 1:1000, anti-eNOS 1:3000, anti-*p105* 1:1000 durante 60 min a 4°C. Seguidamente se lavó la membrana durante 30 seg con TTBS y se realizaron cuatro lavados de 5 min con la misma solución. A continuación, la membrana se incubó durante 60 min a 4°C, con el anticuerpo, anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa diluido en TTBS en la proporción 1:4000. Posteriormente, se lavó la membrana durante 30 seg con TTBS en agitación y cuatro lavados de 5 min.

Finalmente se procedió al desarrollo del revelado por luminiscencia en cámara oscura.

11. Determinación de la producción de NO

Para la determinación de la producción de óxido nítrico en hemocitos se utilizó el sobrenadante obtenido después de la incubación a 20°C de 10^6 hemocitos con ALS suplementado y los inductores seleccionados. Del sobrenadante resultante de la centrifugación se tomaron 50 μl para introducirlos en una de las celdas de la placa junto con:

10 μl de Nitrato reductasa (0.2 unidades/ml)

10 μl de NADPH+H⁺ (2 mM)

Se dejaron transcurrir 20 min y se añadieron:

100 μl de disolución 1 (HCl 20 mM, ácido sulfanílico 10 mM)

Se dejaron transcurrir 20 seg y se añadieron:

100 μl de disolución 2 [N-naftil-1-etilendiamino (NEDA) 10 mM]

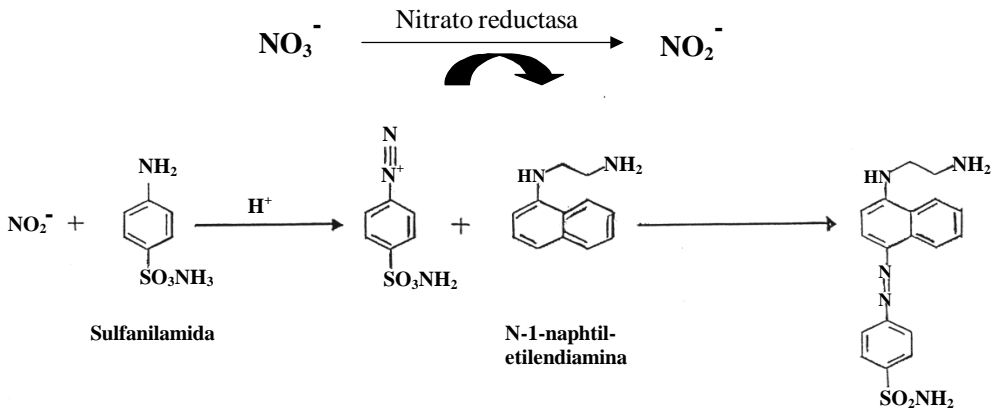


Figura 23. Reacción química del ensayo colorimétrico de Griess. El proceso consta de dos pasos, el primero es la conversión de nitrato a nitrito usando Nitrato Reductasa. El segundo paso consiste en la adición de sulfanilamida al nitrito en medio ácido, que reacciona con el N-1-naftil-etilendiamina (NEDA), originando un compuesto coloreado.

De forma inmediata, se preparó una curva estándar de NO_2Na en ALS con las siguientes concentraciones de nitrito sódico: 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 μM (figura 24). A esta solución, se añadieron 100 μl de la disolución formada por HCl y ácido sulfanílico, se dejaron transcurrir 20 seg para posteriormente añadir 100 μl de la disolución de NEDA. A continuación, se introdujo la placa en un lector y se cuantificó la producción de óxido nítrico a una longitud de onda de 540 nm.

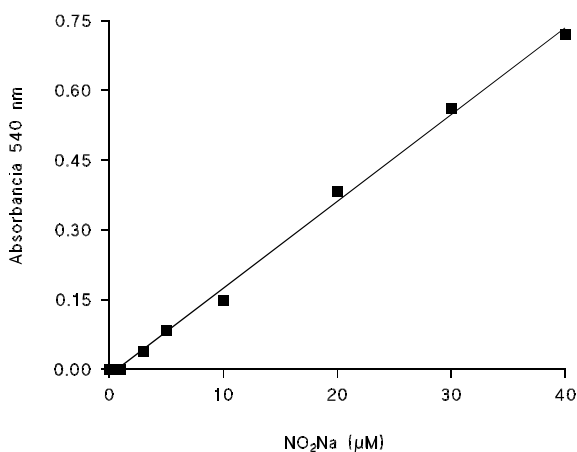


Figura 24. Curva estándar de NO_2Na en ALS

12. Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos.

12.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizaron 3×10^6 hemocitos para cada ensayo. Las suspensiones celulares de hemocitos fueron obtenidas como se ha descrito en el apartado 6. Se recogió el precipitado y se añadieron 150 μl de

TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5), 150 μ l de tampón de lisis celular (2X) (Tris-HCl 400 mM, EDTA 100 mM, SDS 1 %, pH 8,0), 10 μ l de ARNsa (100 mg/ml) y 25 μ l de proteinasa K (10 μ g/ml). En un baño, se incubaron las muestras entre 1-3 horas a una temperatura constante de 56°C. A continuación, se añadió 1 ml de fenol, se agitaron los tubos durante 5 min y se centrifugaron a 4°C durante 10 min a 2800 x g. Se añadió 1 ml de cloroformo:fenol 1:1 (v/v), se agitaron los tubos y se centrifugaron a 4°C durante 10 min a 2800 x g. Por último, se añadió 1 ml de cloroformo, los tubos se agitaron y centrifugaron a 4°C durante 10 min a 2800 x g. Se observó una fase inferior o fase orgánica, en donde se encuentran las proteínas y una fase superior o acuosa, en la que se queda la mayor parte del ADN. Esta fase acuosa, se transfirió a un eppendorf, para añadir a continuación 30 μ l de acetato amónico (3 M) y 750 μ l de etanol al 95% conservado a -20°C y se agitaron los eppendorf en varias ocasiones. Después se dejaron las muestras a -20°C durante toda la noche para que precipitase el ADN. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras durante 10 min a 12000 x g a 4°C, se decantó el etanol al 95 % y se secaron al vacío durante 15 min en un concentrador centrífugo. A continuación, se añadió etanol al 70 % conservado a -20°C , se resuspendieron las muestras de ADN, se centrifugaron las muestras durante 10 min a 12000 x g, para posteriormente decantar el etanol al 70 % y se secaron al vacío durante 15 min en un concentrador centrífugo.

12.2 Determinación de la concentración de ADN

La concentración del ADN se determinó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro. Las longitudes de onda (λ) empleadas fueron 280 nm, longitud de onda de absorbancia para las proteínas y 260 nm, longitud de onda

de absorbancia para los ácidos nucleicos. La absorbancia se midió en diluciones 1:100 de las muestras de ADN en agua milli-Q®. Una absorbancia de 1 corresponde a una concentración de 50 µg/ml para ADN dicatenario. La concentración de este ácido nucleico se calculó como la absorbancia a 260 nm, multiplicándose por 50 y por el factor de dilución. El cociente entre absorbancia a 260 nm y a 280 nm, indica el grado de pureza de las muestras, siendo entre 1,5-2 la relación ideal de pureza para el ADN.

$$[\text{DNA}] \mu\text{g/ml} \quad \Longrightarrow \quad \text{Factor de dilución} \times 50 \times \text{absorbancia } 260 \text{ nm}$$

13. Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa se realiza en cubetas de metacrilato horizontales y requiere dos elementos indispensables: la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil es el medio amortiguado que permite la movilidad de las moléculas cargadas hacia los electrodos correspondientes cuando se genera un campo eléctrico. La fase estacionaria o soporte, es un polímero de naturaleza gelatinosa (agarosa) con un tamaño de poro homogéneo que se sumerge en la fase móvil.

La migración de los fragmentos de ADN en un gel de agarosa sometido a un campo eléctrico depende tanto del voltaje del campo, como del tamaño de poro del gel de agarosa. La separación de los fragmentos de ADN depende tanto de la masa como de la carga de los distintos fragmentos. La localización de los fragmentos una vez finalizada la electroforesis se determina empleando bromuro de etidio (10 mg/ml), que posee grupos tricíclicos, los cuales se mezclan con las bases del ADN, concretamente cada 2,5 pb (Waring, 1965). El

bromuro de etidio, además de ser un agente intercalante, posee la capacidad de disminuir la densidad del ADN y de emitir luz al ser expuesto a luz UV.

13.1 Composición y preparación de los geles

Se preparó un gel de agarosa al 1,5 %, pesando 0,75 g de agarosa diluidos en tampón TAE (Tris 2 M, ácido acético 10 M, EDTA (pH 8,0) 0,5 M) (1X). En un horno microondas, la agarosa se fundió a 80°-90°C durante 30 seg. A continuación, se añadieron a la disolución templada (30°C) 2 µl de bromuro de etidio. Mientras, la disolución se enfriaba, se preparó el molde para depositar la mezcla. Normalmente, los moldes están abiertos por dos de sus extremos, de modo que se sellaron con cinta adhesiva. Una vez sellado el molde, el depósito se realizó con cuidado para evitar la formación de burbujas y principalmente, para evitar *contaminaciones* con el bromuro de etidio, ya que se trata de un compuesto altamente cancerígeno. Con la agarosa todavía líquida, se colocó un peine para formar los pocillos de muestra y se dejó polimerizar. Una vez polimerizado el gel, se retiraron las cintas adhesivas que sellaban los extremos del molde y se cargaron las muestras. Cada muestra fue mezclada con 2 µl de *loading dye* (marcador de frente), ajustándose la carga a 15 µg de ADN por pocillo. La carcasa se relleno con tampón T.A.E. (1X) y se conectó a la fuente de alimentación. La electroforesis se realizó durante 40 min con un voltaje de 100 V a temperatura ambiente. Cuando el frente llegó aproximadamente a 10 mm del final se cortó la corriente y se extrajo el gel. El resultado se visualizó con luz U.V.

14. Método estadístico

El análisis de los datos se realizó con el programa estadístico InStat[™] GraphPad Software, Inc, San Diego, U. S.A.

En primer lugar, era preciso conocer el tipo de distribución de los datos obtenidos. Por ese motivo, se aplicó el test de Bartlett's o test de homogeneidad de varianzas, el cual determina si los datos siguen una distribución normal o de tipo gaussiano. De esta forma, podían aparecer dos supuestos:

1. Los datos tienen una distribución gaussiana, en cuyo caso se aplica el test del análisis de la varianza (ANOVA).
2. Los datos no tienen una distribución gaussiana, en estos casos, se aplica el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

En nuestro caso, la distribución de los datos fue siempre de tipo no gaussiano, aplicándose en todas las situaciones el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

1. Cultivo primario de hemocitos obtenidos de hemolinfa de mejillón

Los hemocitos de *M. galloprovincialis* se obtuvieron tal como se describe en el apartado 5 de Material y Métodos. Transcurrido el tiempo de estabilización, se sustituyó el medio Leibovitz suplementado empleado para el mantenimiento de los hemocitos por ALS suplementado. La sustitución de este tampón se debe a las interferencias que provoca el indicador del medio con los reactivos del método colorimétrico de Griess (Schulz *et al.*, 1999) utilizado para la determinación del óxido nítrico.

Tiempo (horas)	Viabilidad medio Leibovitz suplementado	Viabilidad medio ALS suplementado
0	100%	100%
24	96.5%	94.8%
48	90.15%	85.6%
72	86.10%	83.8%

Tabla 2. Viabilidad de hemocitos incubados en los medios Leibovitz y ALS suplementados, durante tres días de cultivo

Al igual que se había hecho con el medio Leibovitz suplementado, se comprobó la utilidad del medio sin color. Como se observa en la tabla 2, la viabilidad de células mantenidas en el medio ALS suplementado durante 72 horas, es prácticamente igual que la obtenida al emplear el medio Leibovitz L-15 suplementado.

2. Estudio de la producción de NO por *Mytilus galloprovincialis* Lmk.

Una vez comprobada la utilidad del medio ALS suplementado, se procedió al estudio de la producción de óxido nítrico mediante la incubación de hemocitos con LPS, TNF- α , IL-2, PDGF y TGF- β_1 .

Al igual que había sucedido con anteriores trabajos realizados en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, en la síntesis de óxido nítrico, se apreció un cambio progresivo en la respuesta de los hemocitos incubados con estos inductores a lo largo del año, que si bien es muy pequeño de semana en semana, es estadísticamente significativo al comparar los picos máximos. Esta variabilidad de respuestas a lo largo del año permitió agrupar los resultados en dos períodos, invernal y estival. Podemos decir que la etapa comprendida entre septiembre-marzo se corresponde con el período denominado invernal, mientras que la etapa comprendida entre abril-agosto, se corresponde con el período denominado estival.

2.1 Producción de óxido nítrico y expresión proteica en hemocitos

2.1.1 LPS

En la figura 25 se muestra la variación de la producción de NO al ser incubados los hemocitos con LPS [10 ng/ml] a distintos tiempos. Como se puede apreciar, fue a las 6 horas cuando se obtuvo una mayor producción de óxido nítrico; a tiempos de incubaciones mayores, la respuesta se reduce y se estabiliza en valores similares a los obtenidos a las 12 horas de incubación.

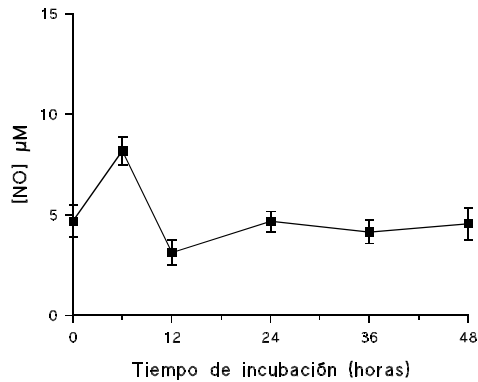


Figura 25. Variación de la producción de NO en función del tiempo de incubación de los hemocitos con LPS [10 ng/ml]

En la figura 26 se muestra la variación de la producción de óxido nítrico con distintas concentraciones de LPS, empleando hemocitos obtenidos de mejillones de invierno y de verano. Se observa que en todos los ensayos realizados, los hemocitos de verano producen a todas las concentraciones de LPS, una cantidad de NO doble que la observada durante el invierno. Durante el período invernal se observa un pequeño incremento en la síntesis de NO al emplear en las incubaciones de hemocitos una concentración de 10 ng/ml de LPS.

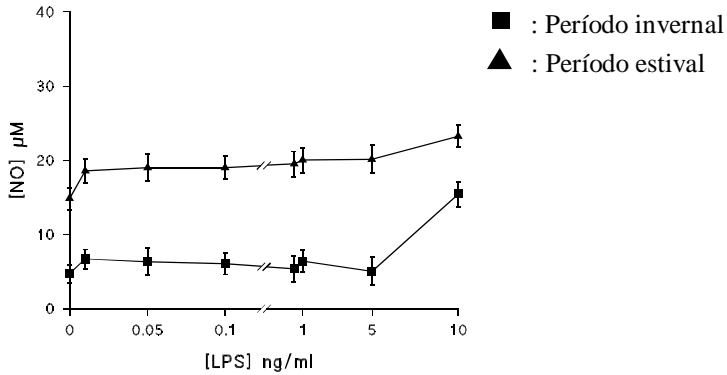


Figura 26. Producción de NO por hemocitos incubados durante 6 horas con distintas concentraciones de LPS durante el período de invierno (■) y de verano (▲)

Una vez valorados la concentración y el tiempo de incubación de los hemocitos con LPS, se estudió la expresión proteica de dichas células.

En la figura 27 se muestran los patrones electroforéticos tanto de células control como de células incubadas con LPS durante los períodos invernal y estival. A simple vista, se aprecian diferencias entre ambos períodos, observando que durante el período estival la intensidad de algunas de las bandas, concretamente las de 108, 85 y 75 kDa, es menor que la observada durante el período invernal. El análisis densitométrico (Figura 27, B) de estas tres bandas, revela que las proteínas de 85 y 71 kDa correspondientes al período estival presentan diferencias muy significativas en relación a células control de invierno. Sin embargo, no se aprecian cambios significativos al comparar células control y células incubadas con LPS en ambos períodos, lo cual revela que las diferencias en la expresión proteica varía según el período estudiado, siendo independiente de la acción del inductor.

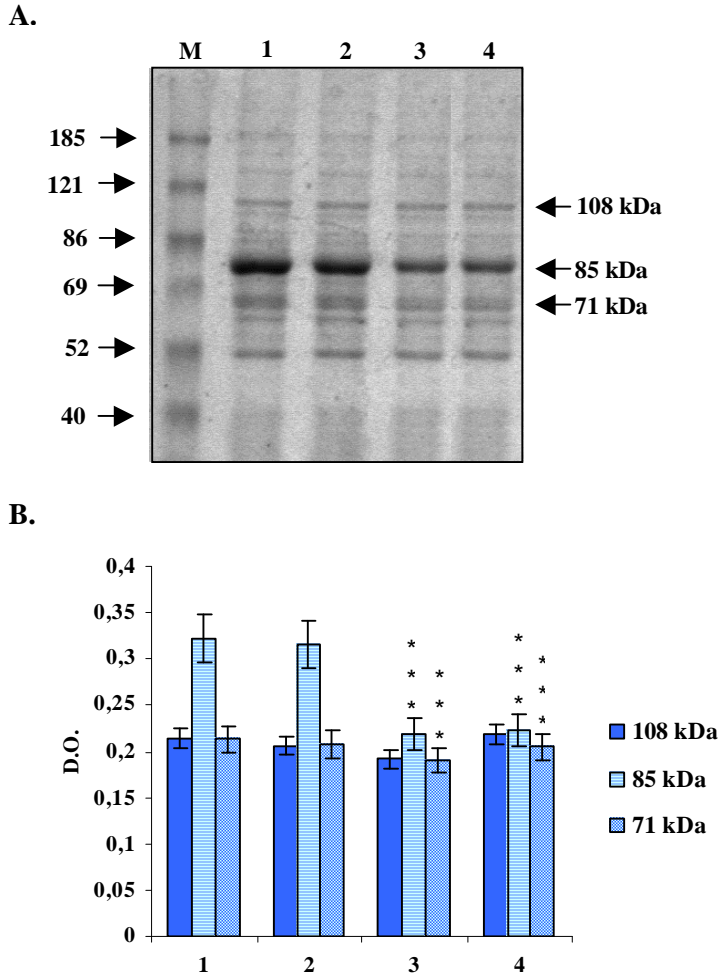


Figura 27. Efecto del LPS [10 ng/ml] sobre la expresión de proteínas en hemocitos incubados durante 6 horas. **A.** SDS-PAGE obtenido a partir de 10^6 células por calle. **M:** marcadores peso molecular. **1:** Células control durante el período de invierno; **2:** Células incubadas con LPS durante el período de invierno; **3:** Células control durante el período de verano; **4:** Células incubadas con LPS durante el período de verano. **B.** Análisis densitométrico de las bandas de proteínas de 108, 85 y 71 kDa. *** $p < 0,001$ valor muy significativo vs células control de invierno, $n=15$

2.1.2 TNF- α

La figura 28 muestra los resultados relativos a la producción de NO al incubar hemocitos de *M. galloprovincialis* con TNF- α [10 ng/ml]. Se observó que la máxima producción de óxido nítrico se obtiene después de 6 horas de incubación, descendiendo de forma brusca la producción de NO con el tiempo.

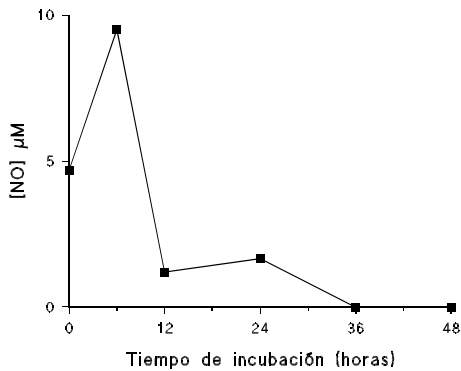


Figura 28. Variación de la producción de NO en función del tiempo de incubación de los hemocitos con TNF- α [10 ng/ml]

La figura 29 muestra los resultados obtenidos durante el período invernal y estival. Como puede observarse, aunque se varíe la concentración de TNF- α la producción de óxido nítrico es prácticamente constante en ambos períodos.

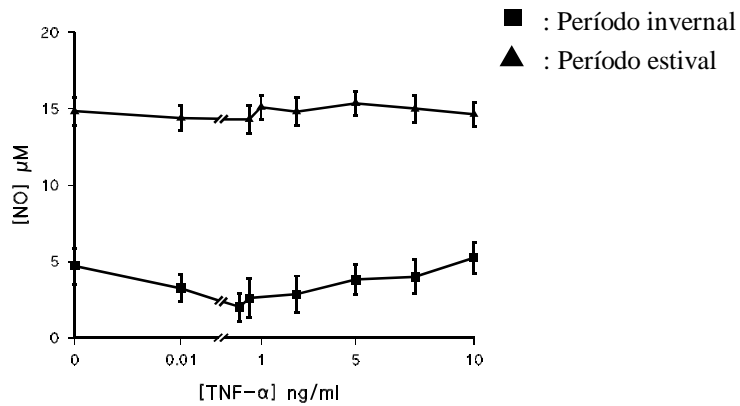
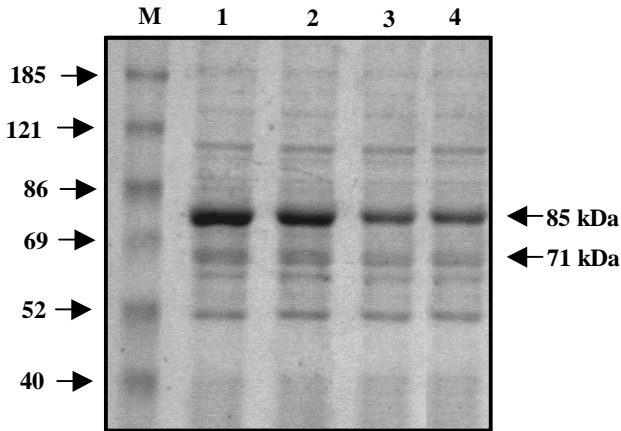


Figura 29. Producción de NO por hemocitos incubados durante 6 horas con distintas concentraciones de TNF- α durante el período de invierno (■) y de verano (▲)

En la figura 30 se muestran los patrones electroforéticos de hemocitos incubados con TNF- α durante los períodos de invierno y de verano. Al igual que sucedía con el LPS, las bandas cuyos pesos moleculares eran de 85 y 71 kDa durante el período estival muestran una menor intensidad que durante el período invernal.

Al realizar el análisis densitométrico (Figura 30, B), se aprecia que existen diferencias muy significativas entre las proteínas de 85 y 71 kDa observadas durante el verano en relación a células control del período invernal. Sin embargo, independientemente del período estudiado, no se aprecian cambios significativos entre células control y células incubadas con TNF- α ; de forma que el TNF- α , no induce modificaciones en la expresión proteica de hemocitos.

A.



B.

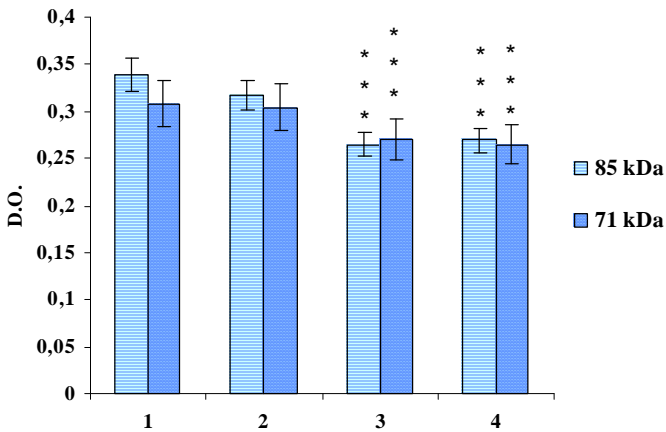


Figura 30. Efecto del TNF- α [10 ng/ml] sobre la expresión de proteínas en hemocitos incubados durante 6 horas. **A.** SDS-PAGE obtenido a partir de 10^6 células por calle. **M:** marcadores peso molecular. **1:** Células control durante el período invernal; **2:** Células incubadas con TNF- α durante el período invernal; **3:** Células control durante el período estival; **4:** Células incubadas con TNF- α durante el período estival. **B.** Análisis densitométrico de las bandas de proteínas de 85 y 71 kDa. *** $p < 0,001$ valor muy significativo vs células control de invierno, $n=15$

2.1.3 IL-2

Al igual que con los anteriores inductores, se determinó el tiempo de incubación de los hemocitos con IL-2 [0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$] con el que se obtuvo una mayor producción de NO. En la figura 31 se aprecia que es a las 24 horas de incubación cuando se observa una elevada producción de óxido nítrico

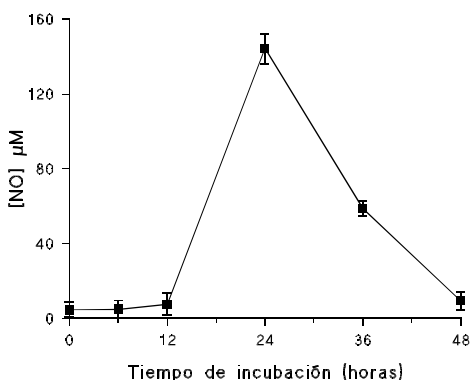


Figura 31. Variación de la producción de NO en función del tiempo de incubación de los hemocitos con IL-2 [0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$]

En la figura 32 se muestran los valores de óxido nítrico liberado por hemocitos incubados con distintas concentraciones de IL-2 durante los períodos estudiados. Durante el período estival, no se aprecian cambios muy significativos en la síntesis de NO y al igual que ocurría con LPS y TNF- α , las células control muestran un pequeño incremento en la producción de óxido nítrico en relación a las del invierno. Durante este período la producción de NO es muy reducida hasta que los hemocitos son incubados con IL-2 a una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se aprecian cambios muy significativos en la síntesis de óxido nítrico.

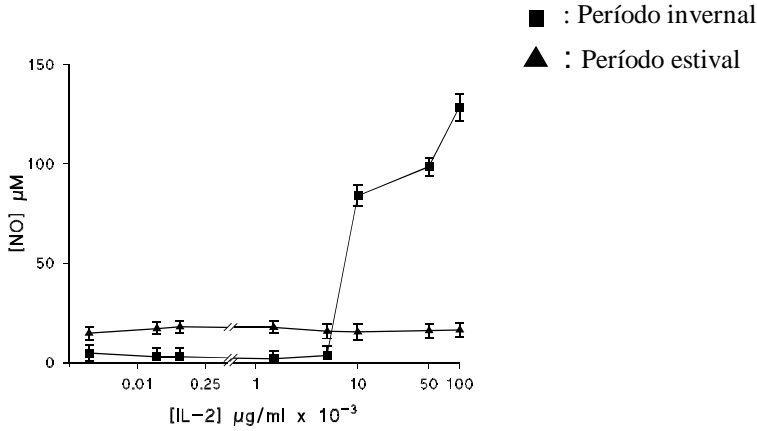


Figura 32. Producción de NO por hemocitos incubados durante 24 horas con distintas concentraciones de IL-2 durante el período de invierno (■) y de verano (▲).

En la figura 33 se muestran los patrones electroforéticos de células incubadas con IL-2 durante los períodos de invierno y de verano. Al igual que sucedía con los anteriores inductores, la expresión de las proteínas durante el período estival es diferente a la expresión proteica del período invernal, siendo más tenue la intensidad de las bandas durante el verano. Las diferencias entre el período invernal y el período estival se comprobaron al realizar el análisis densitométrico (Figura 33, B) de las bandas de 85 y 71 kDa. Este análisis confirma la existencia de diferencias muy significativas en la expresión de proteínas entre células de invierno y de verano.

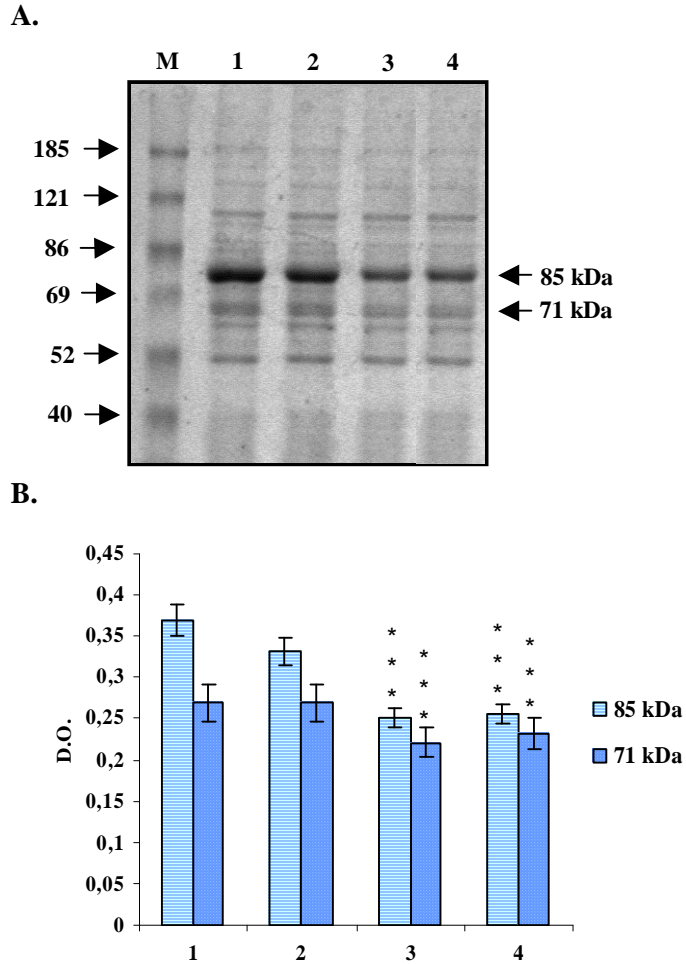


Figura 33. Efecto de la IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$] sobre la expresión de proteínas en hemocitos incubados durante 24 horas. **A.** SDS-PAGE obtenido a partir de 10^6 células por calle. **M:** marcadores peso molecular. **1:** Células control durante el período de invierno; **2:** Células incubadas con IL-2 durante el período de invierno; **3:** Células control durante el período de verano; **4:** Células incubadas con IL-2 durante el período de verano. **B.** Análisis densitométrico de las bandas de proteínas de 85 y 71 kDa. *** $p < 0,001$ valor muy significativo vs células control de invierno, $n=15$

2.1.4 PDGF

A diferencia de los anteriores inductores (LPS, TNF- α y IL-2), la respuesta de los hemocitos incubados con PDGF se traduce en una serie de picos de producción de NO (Figura 34); se aprecia que a los 15 minutos de incubación se obtiene un leve incremento en la síntesis de NO.

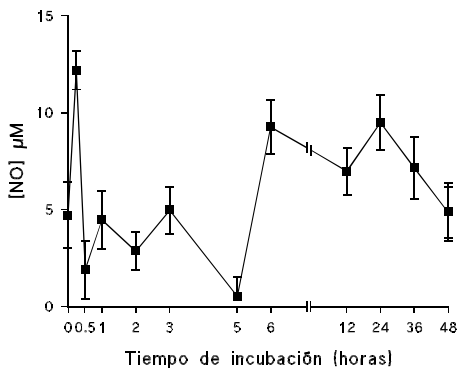


Figura 34. Variación de la producción de NO en función del tiempo de incubación de los hemocitos con PDGF [5 ng/ml]

En la figura 35, se puede percibir que durante el invierno, la producción de NO es menor que la observada durante el verano, aunque en este último período, destaca un descenso brusco en la liberación de NO al utilizar concentraciones elevadas de PDGF. Cabe destacar que en el invierno se obtiene una mayor liberación de óxido nítrico con una concentración de 5 ng/ml, mientras que la producción de NO durante el verano, alcanza un máximo con la mitad de dicha concentración.

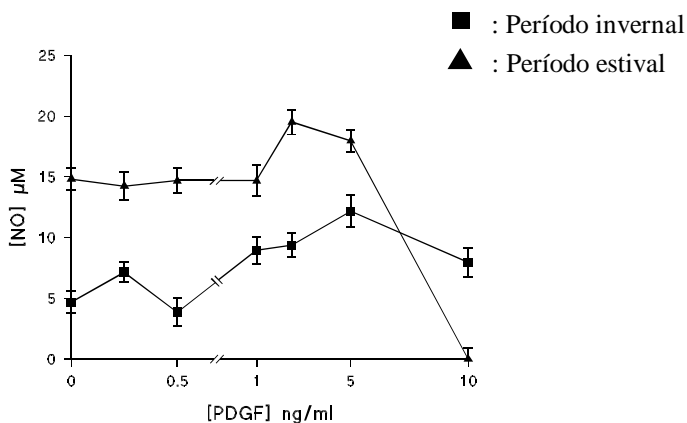
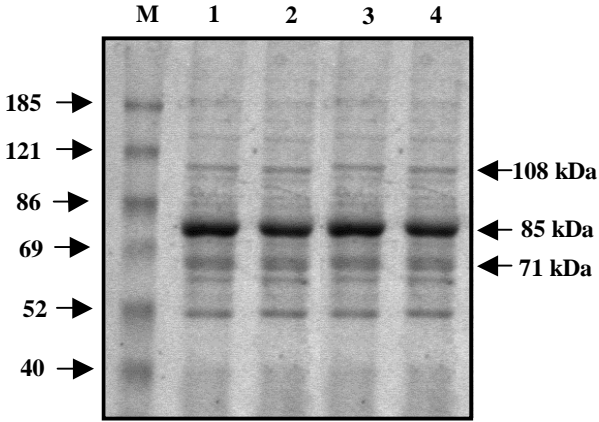


Figura 35. Variación de la producción de NO por hemocitos incubados durante 15 minutos con distintas concentraciones de PDGF durante el período de invierno (■) y de verano (▲).

En la figura 36 se muestran los patrones electroforéticos de hemocitos incubados con PDGF y la variabilidad de respuestas observada en la figura 35 en relación a la síntesis de NO durante ambos períodos del año, no se ve reflejada en la expresión proteica, resultando en esta ocasión la intensidad de las bandas similar en todos los casos.

El análisis densitométrico (Figura 36, B) de tres de esas bandas (108, 85 y 71 kDa) revela que en relación a células control de invierno no existen diferencias significativas entre células control y células incubadas con PDGF ni tampoco entre células incubadas en presencia de PDGF en los períodos de invierno y de verano.

A.



B.

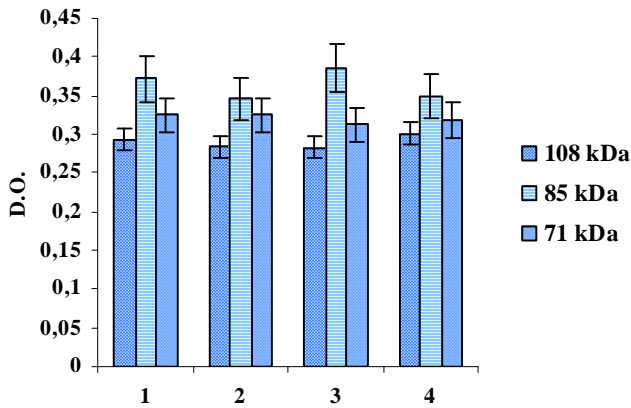


Figura 36. Efecto del PDGF [5 ng/ml] sobre la expresión de proteínas en hemocitos incubados durante 15 minutos. **A.** SDS-PAGE obtenido a partir de 10^6 células por calle. **M:** marcadores peso molecular. **1:** Células control durante el período de invierno; **2:** Células incubadas con PDGF durante el período de invierno; **3:** Células control durante el período de verano; **4:** Células incubadas con PDGF durante el período de verano. **B.** Análisis densitométrico de las bandas de proteínas de 108, 85 y 71 kDa, $n=15$

2.1.5 TGF- β_1

En la figura 37 se muestra la variación de la producción de óxido nítrico al ser los hemocitos incubados con TGF- β_1 a distintos tiempos. Como se puede apreciar es a las 3 horas de incubación cuando se obtiene un incremento en la síntesis de NO.

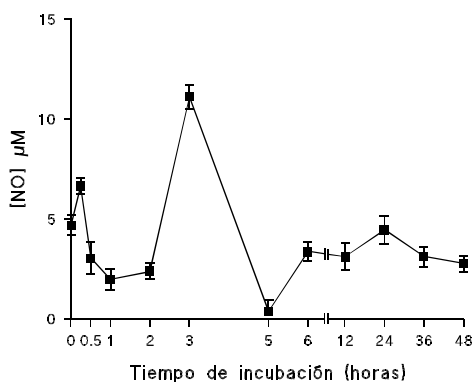


Figura 37. Variación de la producción de NO en función del tiempo de incubación de los hemocitos con TGF- β_1 [0,1 ng/ml]

La figura 38 muestra los resultados obtenidos al incubar los hemocitos con diferentes concentraciones de TGF- β_1 durante el invierno y el verano. Durante el período invernal se observa un aumento en la liberación de NO al ser incubados los hemocitos con TGF- β_1 [0,1 ng/ml]. Sin embargo, durante el período estival, no se aprecia ningún pico en la síntesis de NO y al igual que sucedía en las incubaciones realizadas con los demás inductores, esta síntesis no se altera al emplear diferentes concentraciones de TGF- β_1 .

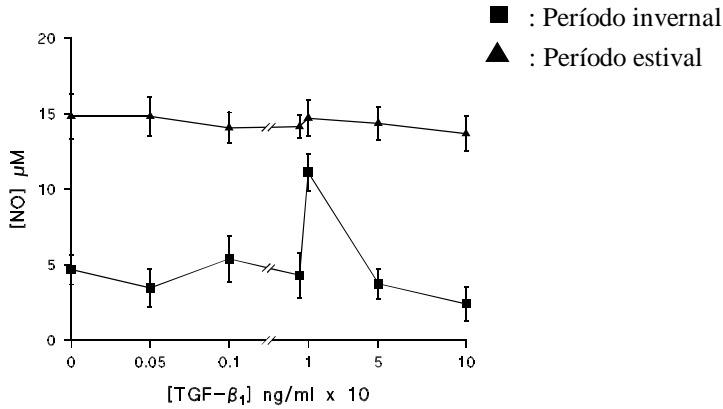


Figura 38. Variación de la producción de NO por hemocitos incubados durante 3 horas con distintas concentraciones de TGF- β_1 durante el período de invierno (■) y de verano (▲).

Al igual que había sucedido con el PDGF, de forma intuitiva, el patrón electroforético de hemocitos incubados con TGF- β_1 no revela diferencias entre los casos estudiados (Figura 39, A).

Mediante el análisis densitométrico de tres bandas de 108, 85 y 71 kDa (Figura 39, B), se comprueba que no existen cambios significativos entre células control y células incubadas en presencia de TGF- β_1 tanto en invierno como en verano y tampoco se observan diferencias muy significativas entre ambos períodos.

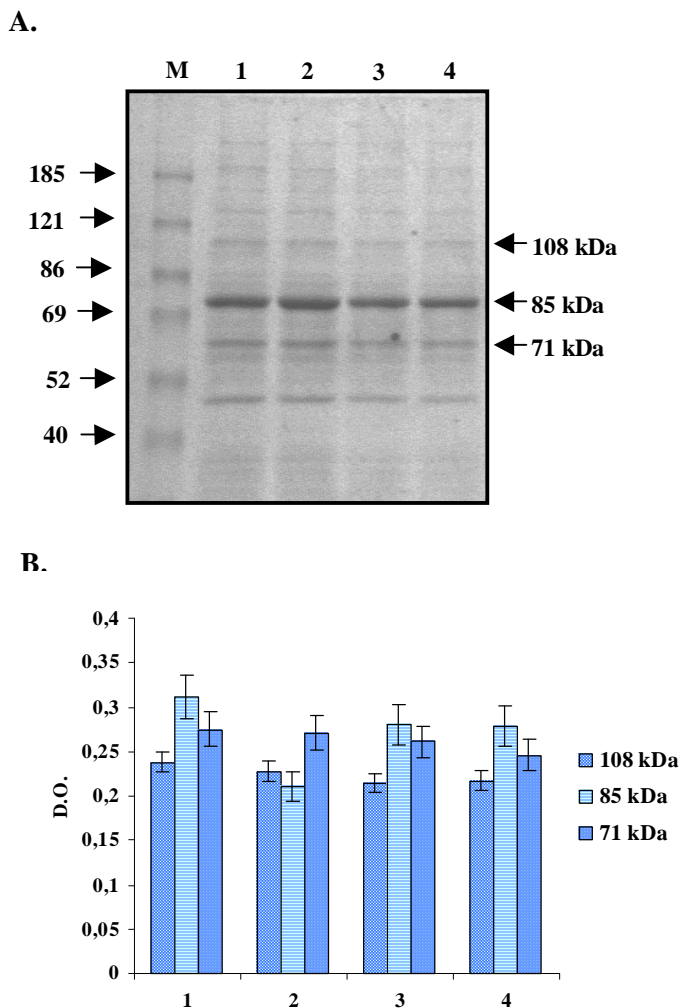


Figura 39. Efecto del TGF- β_1 [0,1 $\mu\text{g/ml}$] sobre la expresión de proteínas en hemocitos incubados durante 3 horas. **A.** SDS-PAGE obtenido a partir de 10^6 células por calle. **M:** marcadores peso molecular. **1:** Células control durante el período de invierno; **2:** Células incubadas con TGF- β_1 durante el período de invierno; **3:** Células control durante el período de verano; **4:** Células incubadas con TGF- β_1 durante el período de verano. **B.** Análisis densitométrico de las bandas de proteínas de 108, 85 y 71 kDa, $n=15$

3. Rutas de señalización implicadas en la producción de óxido nítrico

3.1 Implicación de la PKA en la producción de óxido nítrico

En la tabla 3 se reflejan los resultados de la cuantificación de la síntesis de NO al ser incubados los hemocitos con IL-2 [0,1 µg/ml] y un inhibidor de la PKA (H89) (Chijiwa *et al.*, 1990; Wieprecht *et al.*, 1994).

<i>Incubaciones</i>	<i>Invierno</i>	<i>Verano</i>
Control	4,69 ± 0,03	13,83 ± 0,75
IL-2	128,57 ± 6,5 ^{***}	38,94 ± 0,08 ^{***}
IL-2+H89	12,46 ± 0,16 ^{***}	6,92 ± 0,3 ^{***}

Tabla 3. Producción de óxido nítrico al incubar los hemocitos con IL-2 [0,1 µg/ml] y H89 [100 nM] durante 24 horas. Se representa la media ± desviación estándar de los resultados obtenidos. ^{***}p<0,001 valor muy significativo vs células control; ^{***}p<0,001 valor muy significativo vs células incubadas con IL-2, n=10

En la tabla 3 puede apreciarse que durante el período invernal, la síntesis de óxido nítrico por hemocitos estimulados con IL-2 sufre un incremento notable en relación a la liberada por células control. Sin embargo, el empleo de un inhibidor de la PKA, el H89, provoca un descenso muy significativo en la síntesis de óxido nítrico. A su vez, durante el período estival, se observa que los hemocitos incubados con IL-2 liberan mayor cantidad de óxido nítrico que las células control. Al igual que sucedía durante el invierno, en las incubaciones realizadas con H89 se aprecia una disminución muy significativa de la producción de NO en relación a células incubadas con IL-2.

3.2 Implicación de la PKC en la producción de óxido nítrico

La tabla 4 refleja la producción de óxido nítrico al ser incubados los hemocitos con IL-2 [0,1 µg/ml] y un inhibidor de la actividad de la PKC [bisindolilmaleimida (BSM)] (Gekeler *et al.*, 1996; Ku *et al.*, 1997).

<i>Incubaciones</i>	<i>Invierno</i>	<i>Verano</i>
<i>Control</i>	4,69 ± 0,03	14,83 ± 0,75
<i>IL-2</i>	128,57 ± 6,5 ^{***}	38,94 ± 0,08 ^{***}
<i>IL-2+BSM</i>	106,59 ± 1,06 ^{***}	58,15 ± 0,28 ^{***}

Tabla 4. Producción de óxido nítrico al incubar los hemocitos con IL-2 [0,1 µg/ml] y BSM [25 nM] durante 24 horas. Se representa la media ± desviación estándar de los resultados obtenidos. ^{***}p<0,001 valor muy significativo vs células control; ^{***}p<0,001 valor muy significativo vs células incubadas con IL-2, n=10

Como puede apreciarse, durante el período invernal, la síntesis de óxido nítrico por hemocitos estimulados con IL-2 se incrementa de forma muy significativa en relación a la producida por células control. La incubación de hemocitos con un inhibidor de la PKC, provoca una disminución de la producción de NO que resulta ser estadísticamente muy significativa.

Por el contrario, durante el período estival, se observa que los hemocitos incubados con IL-2 liberan mayor cantidad de óxido nítrico que las células control; mientras que el empleo del inhibidor de la PKC provoca un incremento ligero de la síntesis de óxido nítrico en relación a la producción de NO inducida por hemocitos incubados con IL-2.

En la figura 40 se muestran los resultados obtenidos mediante inmunodetección con anti-*p105*. Como puede observarse en la el caso de extracto

citoplasmático (A), se detectó para todos los ensayos una doble banda de 105 y 108 kDa, mientras que en extracto de membrana (B), solamente se detecta una doble banda de 105 y 108 kDa en células control.

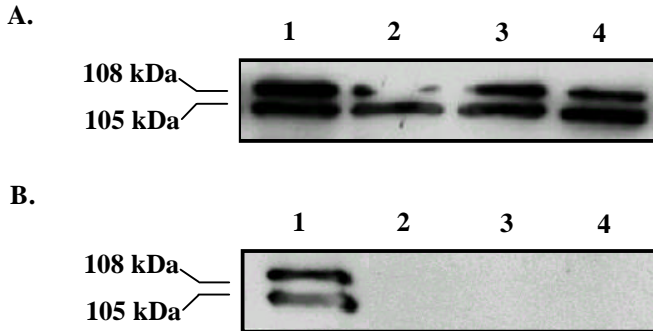


Figura 40. Detección de anti-*p105* en hemocitos incubados con un inhibidor de la PKC, bisindolilmaleimida. **A.** Extracto de citosol. **B.** Extracto de membrana. **1:** Células control; **2:** Células incubadas con IL-2 [0,1 µg/ml]; **3:** Células control incubadas con BSM [25 nM]; **4:** Células incubadas con IL-2 [0,1 µg/ml] y BSM [25 nM]

4. Inmunodetección de óxido nítrico sintetasas

Las inmunodetecciones se realizaron con anticuerpos monoclonales anti-iNOS humana y anti-eNOS bovina. La utilización de anti-iNOS se debe a que la isoforma inducible en mamíferos es la isoforma que puede expresarse al ser las células inducidas con determinadas moléculas como por ejemplo, citoquinas, mientras que la elección de anti-eNOS se debe a que de las isoformas constitutivas, es la endotelial la mejor conservada evolutivamente.

4.1 Óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS)

El empleo del anticuerpo monoclonal anti-iNOS humana en lisados de hemocitos incubados con los distintos inductores estudiados (LPS, TNF- α , IL-2, PDGF y TGF- β_1), reveló la presencia, entre otras, de una banda de 130 kDa, tamaño similar al de la iNOS identificada en otras especies. Esta banda se detectó tanto en ensayos control como en ensayos con hemocitos activados con los inductores utilizados en cada uno de los períodos estudiados, invierno y verano.

Los resultados obtenidos al realizar inmunodetección con anti-iNOS durante el período invernal en extracto citosólico de hemocitos se muestra en la figura 41. A simple vista, se observan diferencias entre cada una de las incubaciones realizadas con distintos inductores, observando un descenso en la intensidad de las bandas detectadas al ser los hemocitos incubados con TNF- α y TGF- β_1 . Para comprobar la existencia de estas diferencias, se realizó un análisis densitométrico (Figura 41, B) de las tres bandas de peso molecular 130, 99 y 55 kDa. En relación a células control, se apreciaron diferencias muy significativas en función del inductor empleado en las incubaciones y de forma detallada podemos decir que:

- la banda de 130 kDa, presenta diferencias muy significativas al ser los hemocitos incubados con TNF- α y TGF- β_1 , mientras que las incubaciones realizadas con IL-2, provocan una mayor producción de óxido nítrico, en este caso, no se aprecian cambios significativos en la expresión de iNOS.
- las bandas de 99 y 55 kDa, presentan diferencias muy significativas al ser incubados los hemocitos con TNF- α , IL-2, PDGF y TGF- β_1 .
- las bandas de 130, 99 y 55 kDa no presentan diferencias al ser incubados los hemocitos con LPS.

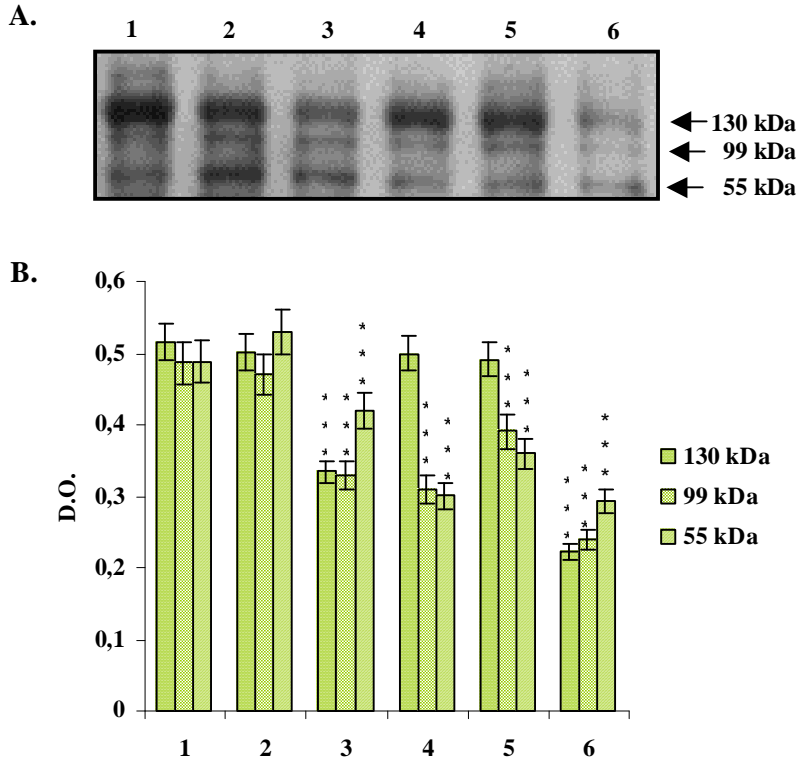


Figura 41. Detección de iNOS en extracto citosólico de hemocitos estimulados con distintos inductores durante el período invernal. **A.** Inmunodetección con anti-iNOS humana. **1:** Células control; **2:** Células incubadas con LPS [10 ng/ml]; **3:** Células incubadas con TNF- α [10 ng/ml]; **4:** Células incubadas con IL-2 [0,1 μ g/ml]; **5:** Células incubadas con PDGF [5 ng/ml]; **6:** Células incubadas con TGF- β_1 [0,1 ng/ml]. **B.** Análisis densitométrico de las bandas de proteínas de 130, 99 y 55 kDa. *** $p < 0,001$ valor muy significativo vs células control de invierno, $n=15$

La inmunodetección de iNOS en lisados de proteínas citosólicas, no sólo se realizó durante el período invernal, sino también durante el período estival (Figura 42, A).

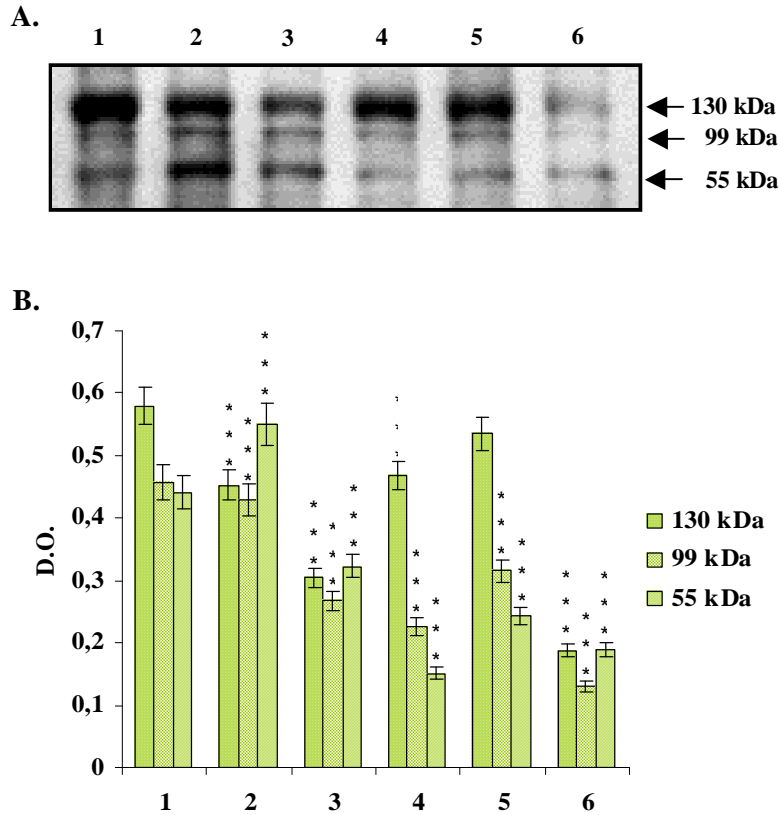


Figura 42. Detección de iNOS en extracto citosólico de hemocitos incubados con distintos inductores durante el período estival. **A.** Inmunodetección con anti-iNOS humana. **1:** Células control; **2:** Células incubadas con LPS [10 ng/ml]; **3:** Células incubadas con TNF- α [10 ng/ml]; **4:** Células incubadas con IL-2 [0,1 μ g/ml]; **5:** Células incubadas con PDGF [5 ng/ml]; **6:** Células incubadas con TGF- β_1 [0,1 ng/ml]. **B.** Análisis densitométrico de las bandas de proteínas de 130, 99 y 55 kDa. *** $p < 0,001$ valor muy significativo vs células control, $n=15$

Las inmunodetecciones revelan la presencia de tres bandas de peso molecular 130, 99 y 55 kDa. Intuitivamente, se aprecian diferencias en la expresión de las proteínas detectadas, de modo que parece disminuir la intensidad de las bandas de hemocitos incubados con TNF- α y TGF- β_1 . Sin embargo, parece que en las

incubaciones realizadas con LPS se observa un incremento en la intensidad de las bandas. El análisis densitométrico (Figura 42, B) de estas tres bandas, revela que en relación a células control existen diferencias muy significativas. De una forma más detallada, la información que aporta el densitograma es la siguiente:

- la banda de 130 kDa presenta diferencias muy significativas al realizar incubaciones con todos los inductores, salvo con el empleo de PDGF.
- las bandas de 99 y 55 kDa presentan diferencias muy significativas en todos los casos.

4.2 Óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS)

El empleo del anticuerpo monoclonal anti-eNOS bovina en lisados de hemocitos incubados con los distintos inductores estudiados (LPS, TNF- α , IL-2, PDGF y TGF- β_1), reveló la presencia de una única banda de 131 kDa, tamaño similar al de la eNOS identificada en otras especies.

En la figura 43, se muestran los resultados obtenidos al realizar inmunodetección con anti-eNOS en extracto citosólico de hemocitos incubados con las combinaciones de los inductores estudiados y la IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$] durante el período invernal. La razón para realizar estas combinaciones, se debe a que la IL-2, de todos los inductores estudiados, es el que provoca en hemocitos una mayor producción de óxido nítrico y se creyó que las combinaciones entre los inductores tendrían un efecto sinérgico sobre la síntesis de óxido nítrico.

En citosol se detecta una banda de 131 kDa, tamaño similar al de la eNOS identificada en otros organismos (135 kDa). Intuitivamente, se aprecia que la banda detectada en hemocitos incubados con la combinación de IL-2

con LPS, PDGF o TGF- β_1 , presenta una mayor intensidad que la observada al realizar incubaciones solamente con IL-2.

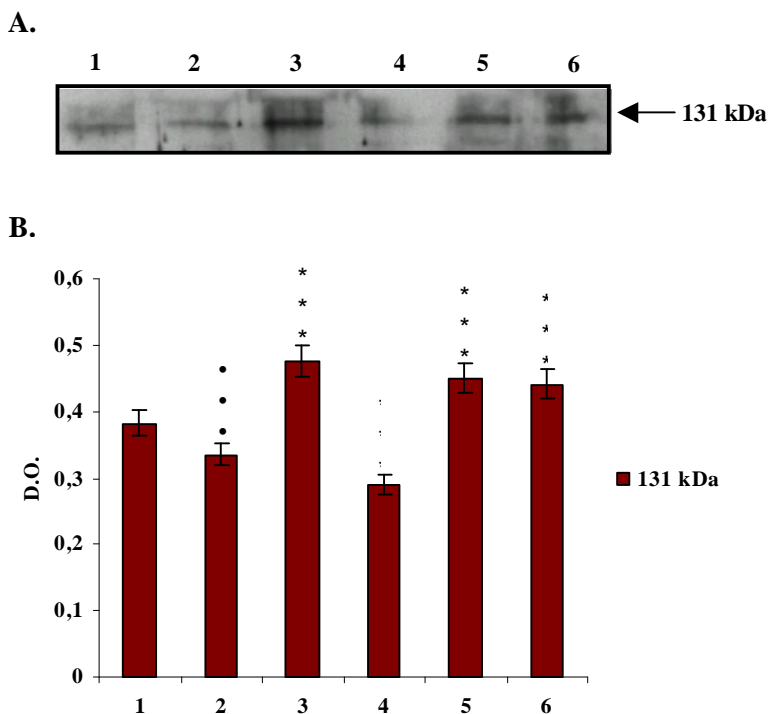


Figura 43. Detección de eNOS en extracto citosólico de hemocitos incubados con distintos inductores durante el período invernal. **A.** Inmunodetección con anti-eNOS bovina. **1:** Control; **2:** IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$]; **3:** IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$] y LPS [10 ng/ml]; **4:** IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$] y TNF- α [10 ng/ml]; **5:** IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$] y PDGF [5 ng/ml]; **6:** IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$] y TGF- β_1 [0.1 ng/ml]. **B.** Análisis densitométrico de la banda de 131 kDa. ** $p < 0,001$ valor muy significativo vs células control; *** $p < 0,001$ valor muy significativo vs células incubadas con IL-2, $n=15$

El análisis densitométrico de la única banda detectada (131 kDa) revela la existencia de diferencias muy significativas entre células control y células incubadas con IL-2. A su vez, resulta que en el caso del empleo de

los otros inductores (LPS, TNF- α , PDGF y TGF- β_1) en combinación con la IL-2 se observan diferencias muy significativas en relación a los hemocitos incubados solamente con IL-2.

Al realizar inmunodetección con anti-eNOS en extracto de membrana de hemocitos incubados en las condiciones anteriormente citadas, no se detectó ninguna banda.

5. Presencia de *p105* en hemocitos de *M. galloprovincialis*

Se estudió la presencia en citosol y en membrana de *p105* (Mercado *et al.*, 2002a; 2002b; 2003), en hemocitos incubados con distintos inductores durante los períodos de invierno y de verano.

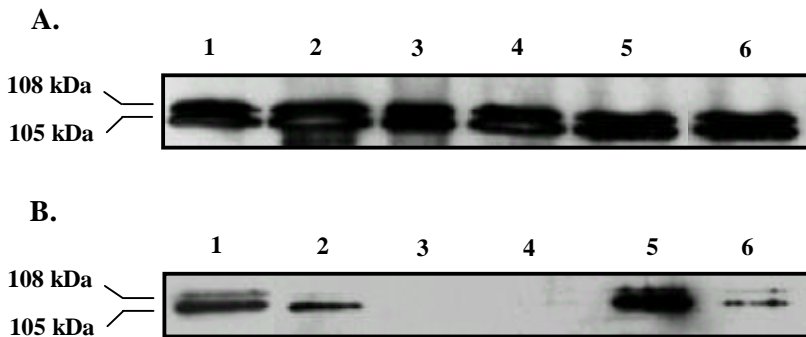


Figura 44. Inmunodetección con anti-*p105* en hemocitos incubados con distintos inductores durante el período invernal. **A:** Extracto citosólico. **B:** Extracto de membrana. **1:** Células control; **2:** Células incubadas con LPS [10 ng/ml]; **3:** Células incubadas con TNF- α [10 ng/ml]; **4:** Células incubadas con IL-2 [0,1 μ g/ml]; **5:** Células incubadas con PDGF [5 ng/ml]; **6:** Células incubadas con TGF- β_1 [0,1 ng/ml].

En el período invernal y en el caso del citosol (Figura 44, A), la inmunodetección realizada con un anticuerpo anti-*p105* reveló la presencia de dos bandas de 105 y 108 kDa. Como puede apreciarse, las bandas detectadas aparecen

con la misma intensidad en todos los ensayos realizados. Sin embargo, en el caso de membrana (Figura 44, B), se observa la permanencia de doble banda en células control, en las incubadas con PDGF y TGF- β_1 , aunque en estos últimos la banda de 108 kDa es muy tenue. En el caso de las incubaciones realizadas con TNF- α e IL-2, se aprecia claramente la desaparición de las bandas de 105 y 108 kDa; mientras que en las incubaciones realizadas con LPS, se detecta una única banda de 105 kDa.

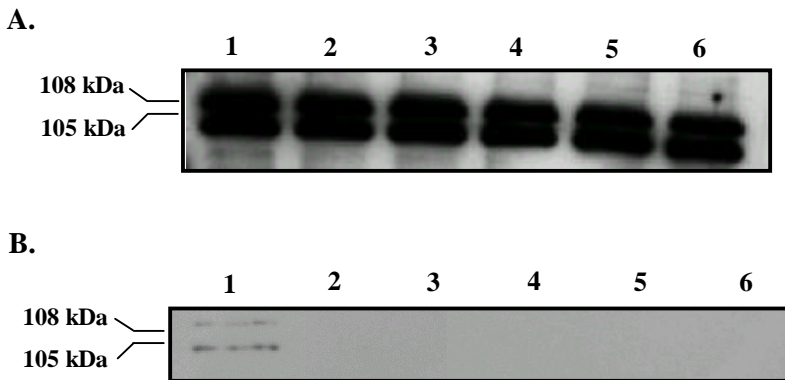


Figura 45. Inmunodetección con anti-*p105* en hemocitos incubados con distintos inductores durante el período estival. **A.** Extracto citosólico. **B.** Extracto de membrana. **1:** Células control; **2:** Células incubadas con LPS [10 ng/ml]; **3:** Células incubadas con TNF- α [10 ng/ml]; **4:** Células incubadas con IL-2 [0,1 μ g/ml]; **5:** Células incubadas con PDGF [5 ng/ml]; **6:** Células incubadas con TGF- β_1 [0,1 ng/ml].

La figura 45 muestra los resultados obtenidos durante el período estival. Como puede apreciarse en citosol (Figura 45, A), se detecta una doble banda, correspondiente a 105 y 108 kDa en todos los ensayos estudiados. En el caso de extracto de membrana (Figura 45, B) sólo se detecta una doble banda correspondiente a 105 y 108 kDa en los hemocitos control, mientras que en los hemocitos incubados con los inductores, se aprecia la desaparición de ambas bandas.

En esta ocasión, al igual que se había realizado en las inmunodetecciones con anti-eNOS, se tomaron como modelo las incubaciones realizadas con IL-2, así como las correspondientes combinaciones de esta citoquina con los demás inductores.

En la figura 46 se muestran los resultados obtenidos durante el período de invierno. En el caso del citosol (Figura 46, A), se detecta una doble banda, correspondiente a 105 y 108 kDa. Sin embargo en membrana (Figura 46, B) se detecta únicamente una doble banda en células control.

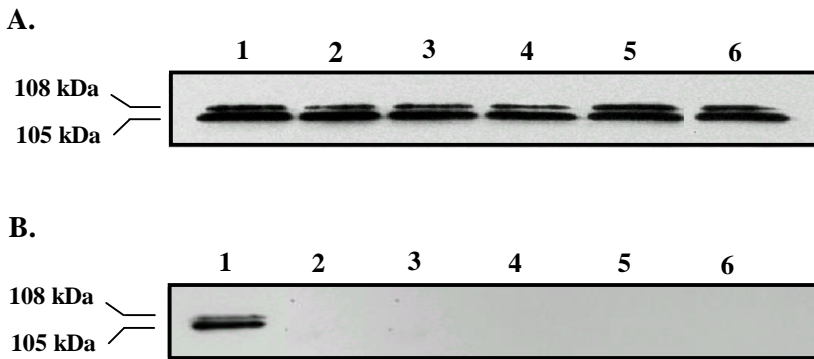


Figura 46. Inmunodetección con anti-*p105* en hemocitos incubados con distintos inductores durante el período invernal. **A.** Extracto citosólico. **B.** Extracto de membrana. **1:** Células control; **2:** Células incubadas con IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$]; **3:** Células incubadas con IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$] y LPS [10 ng/ml]; **4:** Células incubadas con IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$] y TNF- α [10 ng/ml]; **5:** Células incubadas con IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$] y PDGF [5 ng/ml]; **6:** Células incubadas con IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$] y TGF- β_1 [0,1 ng/ml].

Posteriormente, se realizaron los ensayos con la IL-2 y las combinaciones con inductores durante el período estival. Tanto en citosol (Figura 47, A) como en membrana (Figura 47, B), se observaron los mismos resultados que se habían obtenido durante el período invernal.

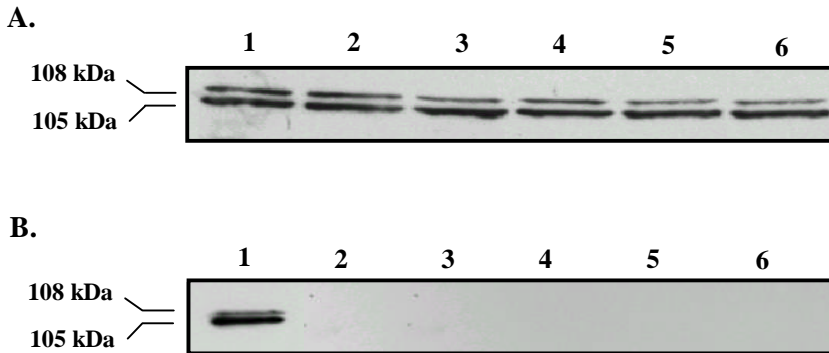


Figura 47. Inmunodetección con anti-*p105* en hemocitos incubados con distintos inductores durante el período estival. **A.** Extracto citosólico. **B.** Extracto de membrana. **1:** Células control; **2:** Células incubadas con IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$]; **3:** Células incubadas con IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$] y LPS [10 ng/ml]; **4:** Células incubadas con IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$] y TNF- α [10 ng/ml]; **5:** Células incubadas con IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$] y PDGF [5 ng/ml]; **6:** Células incubadas con IL-2 [0,1 $\mu\text{g/ml}$] y TGF- β_1 [0,1 ng/ml].

6. Comportamiento de hemocitos de mejillón durante los años 2003-2004

Durante los años 2003 y 2004, el comportamiento de los hemocitos fue diferente al observado en los años anteriores (2001 y 2002), ya que aunque se conservaron las condiciones para el tiempo de incubación y la concentración del inductor empleado, no se apreció liberación de óxido nítrico por hemocitos de *Mytilus galloprovincialis*.

En la figura 48 se muestra el patrón electroforético de proteínas citosólicas de hemocitos incubados con LPS, TNF- α , IL-2, PDGF y TGF- β_1 durante el período invernal.

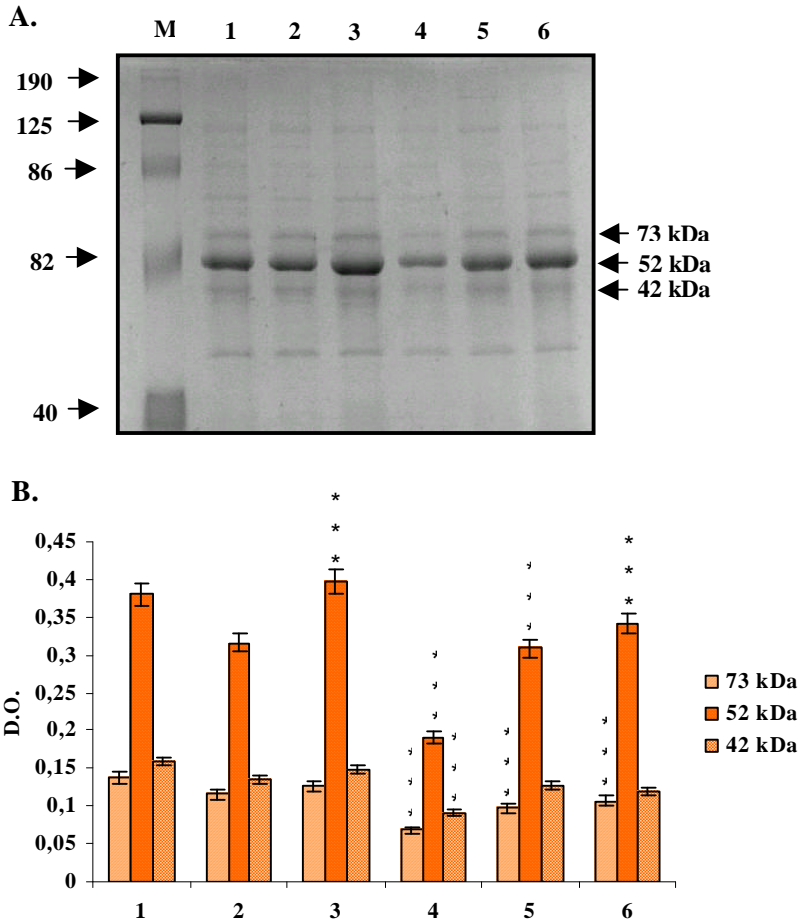


Figura 48. Estudio de la expresión de proteínas de citosol de hemocitos incubados durante el período invernal. **A.** SDS-PAGE obtenido a partir de 10^6 células por calle. **M:** marcadores peso molecular. **1:** Células control; **2:** Células incubadas con LPS [10 ng/ml]; **3:** Células incubadas con TNF- α [10 ng/ml]; **4:** Células incubadas con IL-2 [0,1 μ g/ml]; **5:** Células incubadas con PDGF [5 ng/ml]; **6:** Células incubadas con TGF- β_1 [0,1 ng/ml]. **B.** Análisis densitométrico de las bandas de proteínas de 73, 52 y 42 kDa. *** $p < 0,001$ valor muy significativo vs células control de invierno, $n=15$

De forma intuitiva, parece que los patrones proteicos son similares, aunque cabe destacar que algunas bandas (73, 52 y 42 kDa), presentan

diferencias en la intensidad dependiendo del inductor utilizado en las incubaciones. Para comprobar la existencia de estas diferencias, se procedió al análisis de cada banda, resultando un densitograma (Figura 48, B) que revela que en relación a células control:

- la banda que se corresponde con 73 kDa, presenta diferencias muy significativas al emplear en las incubaciones IL-2 y PDGF.
- la banda que se corresponde con 52 kDa, presenta diferencias muy significativas en las incubaciones realizadas con TNF- α , IL-2, PDGF y TGF- β_1 .
- la banda de 42 kDa, presenta diferencias muy significativas al incubar los hemocitos en presencia de IL-2.

En la figura 49 se observa la expresión de proteínas de membrana de hemocitos incubados durante el período invernal con los inductores citados anteriormente. A simple vista resulta llamativa la presencia de una única banda de 52 kDa, observándose diferencias en la expresión proteica de hemocitos incubados en presencia de los distintos inductores (LPS, TNF- α , IL-2, PDGF y TGF- β_1) y destacando la baja intensidad de la banda obtenida mediante las incubaciones realizadas con IL-2. El análisis densitométrico (Figura 49, B) de los perfiles proteicos, revela que en relación a células control existen diferencias muy significativas de la banda de 52 kDa en todos los casos, excepto en las incubaciones realizadas con TNF- α .

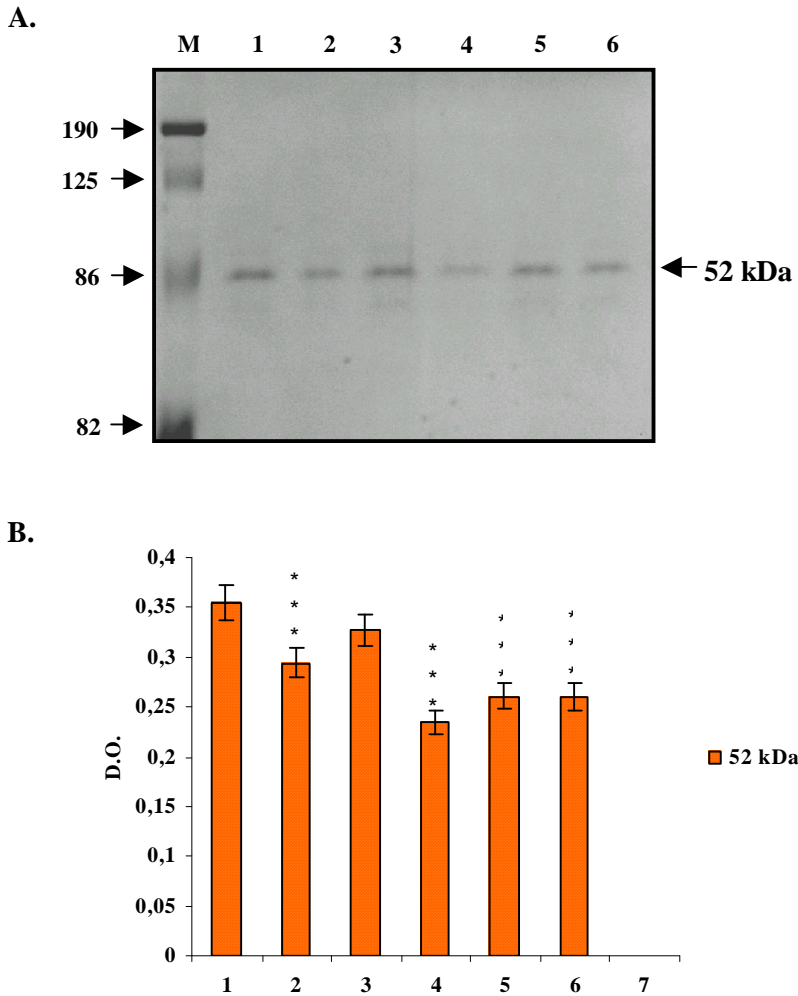


Figura 49. Estudio de la expresión de proteínas de membrana de hemocitos incubados durante el período invernal. **A.** SDS-PAGE obtenido a partir de 10^6 células. **M:** marcadores peso molecular. **1:** Células control; **2:** Células incubadas con LPS [10 ng/ml]; **3:** Células incubadas con TNF- α [10 ng/ml]; **4:** Células incubadas con IL-2 [0,1 μ g/ml]; **5:** Células incubadas con PDGF [5 ng/ml]; **6:** Células incubadas con TGF- β_1 [0,1 ng/ml]. **B.** Análisis densitométrico de la banda de proteína de 52 kDa. **n=15.** *** $p < 0,001$ valor muy significativo vs células control de invierno, **n=15**

En el caso de los patrones electroforéticos tanto de citosol como de membrana obtenidos al incubar los hemocitos con los inductores durante el período estival, los resultados fueron similares a los observados durante el período invernal.

Los resultados obtenidos durante estos dos años, 2003 y 2004, al realizar inmunodetecciones con anticuerpos monoclonales anti-iNOS humana y con anti-eNOS bovina, contrastan con los resultados expuestos en el apartado 4 de Resultados, puesto que ni en citosol ni en membrana se detectaron iNOS y eNOS para ninguno de los inductores estudiados.

7. Estudio de las poblaciones de hemocitos de *M. galloprovincialis*

Como se ha mencionado en el apartado anterior, se observaron años de producción de óxido nítrico y otros años en los que no se detectaba producción de óxido nítrico. En un principio, se creyó que esta variabilidad en la producción de NO podría deberse a cambios en el número de células totales por kg de mejillón en años consecutivos (2001-2004).

La tabla 5 refleja el recuento de células totales por kg de mejillón durante los períodos de invierno y de verano en años consecutivos, tomando como células control las del año 2001.

En primer lugar, se compararon los valores de células totales por kg de mejillón durante los años del trabajo experimental. Tal como se observa en la tabla, en relación a células totales del año 2001 sólo resulta muy significativa la diferencia de células totales durante el año 2002 en el período invernal. Sin embargo, durante el período estival, se aprecia que las diferencias resultan muy significativas en el recuento de células totales de los años 2002 y 2003. En el resto de los casos, no se observan cambios significativos.

En segundo lugar, se compararon los resultados obtenidos durante el período invernal y estival. En esta ocasión y tomando como referencia los datos conseguidos durante el invierno, resulta que el número de células totales durante los años 2001, 2002 y 2004 presentan diferencias muy significativas en relación al recuento obtenido en invierno.

<i>Año</i>	<i>Invierno</i>	<i>Verano</i>
2001	11,57 ± 0,02	15,25 ± 0,03 ^{***}
2002	16,4 ± 0,07 ^{***}	19,18 ± 0,05 ^{***/***}
2003	11,56 ± 0,1	12,08 ± 0,08 ^{***}
2004	10,6 ± 0,04	15,27 ± 0,01 ^{***}

Tabla 5. Recuento en millones de células totales por kg de mejillón durante el período invernal y estival en años consecutivos. Se representa la media ± desviación estándar. ***p<0,001 valor muy significativo vs células totales del años 2001; ••• p<0,001 valor muy significativo vs células de invierno, n=150

En la tabla 6, se muestra la proporción de los dos tipos celulares hallados en hemolinfa de *M. galloprovincialis*, células RH y células SH (Barcia *et al.*, 1999; Cao *et al.*, 2003) durante los períodos invernal y estival en años consecutivos. Se aprecia que durante los dos períodos, la proporción de células SH siempre supera a la de células RH, salvo en el período estival del año 2001.

Año	Invierno	Verano
2001	SH 54 ± 0,02	SH 29 ± 0,07
	RH 46 ± 0,05	RH 71 ± 0,09
2002	SH 61 ± 0,08***	SH 53 ± 0,05***
	RH 39 ± 0,04	RH 47 ± 0,03
2003	SH 73 ± 0,06***	SH 64 ± 0,02***
	RH 27 ± 0,01	RH 36 ± 0,06
2004	SH 84 ± 0,03***	SH 68 ± 0,07***
	RH 16 ± 0,01	RH 32 ± 0,04

Tabla 6. Porcentaje de poblaciones celulares de hemolinfa de *M. galloprovincialis* durante el período invernal y estival en años consecutivos. Se representa la media ± desviación estándar.

*** p < 0,001 valor muy significativo vs poblaciones celulares del año 2001, n=150

8. Inducción de apoptosis

De todos los inductores estudiados (LPS, TNF- α , IL-2, PDGF, TGF- β_1) y un inhibidor de la síntesis proteica [cicloheximida (CHX)] empleados en las incubaciones de hemocitos de mejillón, sólo se aprecia apoptosis con CHX, TNF- α y TGF- β_1 . Cabe destacar que la inducción de apoptosis ocurre exclusivamente durante los años 2003 y 2004, período en el cual se comprobó que los hemocitos eran incapaces de sintetizar NO.

A continuación, se muestran los tiempos de incubación y las concentraciones utilizadas de los distintos inductores de la apoptosis:

<i>Inductor</i>	<i>Concentración</i>	<i>Tiempo</i>
CHX	[100 µg/ml]	6 horas
TGF- β_1	[0,1 ng/ml]	6 horas
TNF- α	[10 ng/ml]	6 horas

Tabla 7. Inductores de la apoptosis en hemocitos de mejillón, concentraciones y tiempos de incubación.

En la figura 51 se muestran los resultados obtenidos al incubar los hemocitos con CHX [100 µg/ml] y TGF- β_1 [0,1 ng/ml] durante 6 horas.

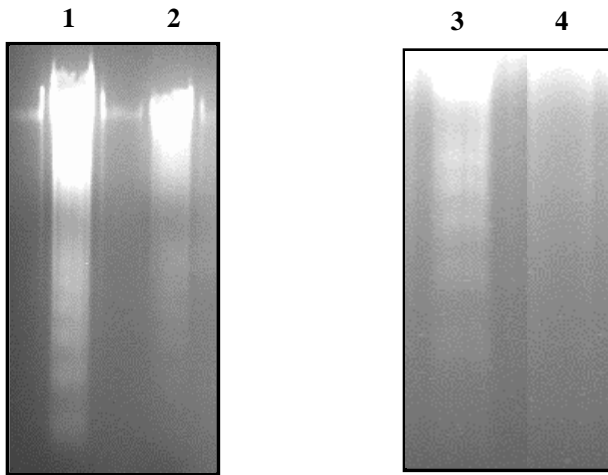


Figura 51. Fragmentos de ADN de hemocitos apoptóticos incubados durante 6 horas con CHX y TGF- β_1 . 2 y 4: Control; 1: CHX [100 µg/ml]; 3: TGF- β_1 [0,1 ng/ml]

Como se aprecia en las células control, el ADN aparece sin degradar casi en el mismo punto de carga, mientras que en las células apoptóticas se detecta el ADN degradado en fragmentos que son generalmente múltiplos de 200-300 pb.

En las incubaciones realizadas durante 6 horas con TNF- α [10 ng/ml] se obtuvo una doble respuesta (Figura 52).

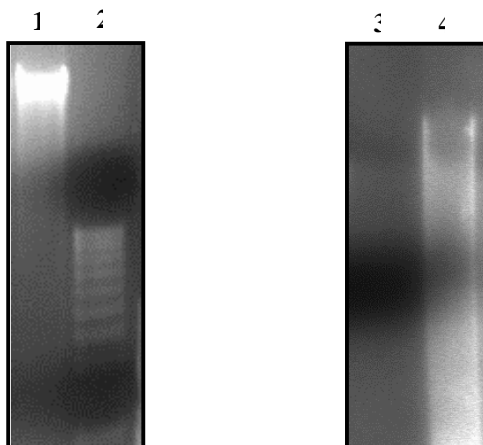


Figura 52. Apoptosis y necrosis de hemocitos incubados durante 6 horas con TNF- α . **1 y 3:** Control; **2:** TNF- α durante período invernal; **4:** TNF- α durante período estival

En la figura 52, se pueden apreciar los distintos resultados obtenidos al realizar incubaciones con TNF- α . Así, durante el período invernal, se aprecian los fragmentos de ADN característicos de la apoptosis; mientras que durante el período estival, las incubaciones de hemocitos en las mismas condiciones de concentración y tiempo utilizadas en el período invernal, no se apreció una *escalera* de fragmentos, sino una degradación total del ADN.

El cultivo *in vitro* de células de moluscos marinos fue abordado por varios investigadores, pero siempre con éxito limitado. Hasta muy recientemente, sólo se había conseguido mantener en cultivo una línea celular de *Biomphalaria glabrata* (Power *et al.*, 1998). En anteriores trabajos realizados en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria de Lugo, se consiguió una viabilidad de hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* mantenidos en medio Leibovitz L-15 suplementado con FCS de hasta 40 días, manteniéndose las células en fase estable durante más de 20 días después del inicio del cultivo. No obstante, para los inductores estudiados (LPS, IL-2, PDGF, TGF- β_1 , ACTH, ACTH 1-24, EGF), es a los 3 días cuando se obtiene la mejor respuesta de las células que expresaban la cadena α del receptor para IL-2 (Cao *et al.*, 2003).

A lo largo de estos años, diversos grupos de investigación enfocaron sus trabajos sobre el estudio de la generación de óxido nítrico por hemocitos de diferentes especies de invertebrados como por ejemplo *M. edulis* (Conte y Ottaviani, 1995; Franchini *et al.*, 1995), *M. galloprovincialis* (Arumugan *et al.*, 2000a; 2000b; Gourdon *et al.*, 2001; Torreilles y Guèrin, 2001), *Ruditapes decussatus* y *Crassostrea gigas* (Arumugan *et al.*, 2000a; 2000b), debido a la implicación de esta molécula en la respuesta del sistema inmune. Sin embargo y a diferencia de nuestro trabajo, todos estos estudios sobre la producción de óxido nítrico, se realizaron con hemocitos extraídos directamente del animal, sin estabilizar las células en un medio celular. En nuestro caso, el medio empleado para el cultivo primario de hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* interfiere en la cuantificación del óxido nítrico realizado por el método de Griess (Schulz *et al.*, 1999), por lo que se adaptó un medio alternativo, denominado ALS suplementado, en el cual las células se mantuvieron en fase estable durante 3 días (Resultados, tabla 2).

Al ser considerados los hemocitos de invertebrados semejantes a los macrófagos de vertebrados se cree que por ello, deben de comportarse de forma similar a ellos (Franchini *et al.*, 1995; Aktan, 2004). De modo que en las incubaciones se emplearon cinco moléculas que poseen la capacidad de inducir la síntesis y la liberación de óxido nítrico en diversos tipos celulares de vertebrados como macrófagos, células alveolares, monocitos, astrocitos, células T, etc. (Ottaviani *et al.*, 1993b; Liew, 1994; Renè y Spitzer, 1997; Kwak *et al.*, 2000; Tepperman *et al.*, 2000; Pham *et al.*, 2003).

Los inductores utilizados en hemocitos fueron un antígeno (LPS, lipopolisacárido asociado a la membrana de bacterias Gram-negativas) y cuatro citoquinas (factor de necrosis tumoral α , interleuquina 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento transformante β_1).

Al igual que sucede con los diferentes tipos celulares de vertebrados, la respuesta de hemocitos de *M. galloprovincialis* varía según el inductor utilizado. El ejemplo más evidente lo representa el LPS, dado que diversos trabajos apoyan la consideración del lipopolisacárido como uno de los mejores inductores de respuestas del sistema inmune (Lowenstein *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1994; Alley *et al.*, 1995; St-Denis *et al.*, 1998; Eun *et al.*, 2000; Yamate *et al.*, 2001; Zinyama *et al.*, 2001). En nuestro caso, el LPS no induce la producción de NO en hemocitos, siendo estos resultados similares a los obtenidos en monocitos humanos por Pham *et al.* (2003). A su vez, no se obtuvo una mejor respuesta de los hemocitos al ser incubados con combinaciones de LPS con los demás inductores estudiados (TNF- α , IL-2, PDGF y TGF- β_1), por lo menos, no al tiempo de máxima activación determinado para el lipopolisacárido. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Conte y Ottaviani (1995) en macrófagos de mamíferos, en los que aprecian una mayor respuesta al ser incubados los macrófagos con combinaciones del LPS con otros inductores.

Aunque el LPS no induce la síntesis directa de óxido nítrico, en hemocitos se conoce la implicación de esta molécula en la liberación de catecolaminas (Cao *et al.*, 2004a), las cuales ya habían sido detectadas anteriormente en varios tejidos de moluscos (Sloley *et al.*, 1990; Voronezhskaya *et al.*, 1999) y en hemolinfa de moluscos gasterópodos (Manger *et al.*, 1996; Pani y Croll, 2000; Santhanagopalan y Yoshino, 2000). Incluso existen diversos estudios que afirman que las catecolaminas de invertebrados poseen las mismas características que las presentes en vertebrados (Osada y Nomura, 1989; Pani y Croll, 2000; Lacoste *et al.*, 2001).

En hemocitos de *M. galloprovincialis* de los inductores empleados, es la IL-2 el mejor para provocar la síntesis de óxido nítrico (Resultados, figura 31). Estas afirmaciones se apoyan en trabajos realizados en nuestro laboratorio en años anteriores, los cuales han permitido detectar la presencia de un receptor para IL-2 en células de mejillón, siendo este receptor similar al de las células de vertebrados (Barcia *et al.*, 1999), confirmando a su vez los estudios realizados por Ottaviani *et al.* (1998) que sugieren la existencia de receptores específicos para cada citoquina.

Los resultados obtenidos en las curvas de concentración con todos los inductores, destacan por dos motivos. En primer lugar, la producción de óxido nítrico es totalmente diferente en los dos períodos estudiados (invernal y estival). Así, durante el invierno, en el caso de la IL-2 y PDGF (Resultados, figuras 32 y 35) se observan variaciones bruscas en la síntesis de óxido nítrico al variar la concentración de los inductores citados.

En segundo lugar, durante el verano las células control muestran en todos los casos, un leve incremento en la producción de óxido nítrico en relación a las células control de invierno. A su vez, la producción de NO por hemocitos incubados con LPS, TNF- α , IL-2 y TGF- β_1 (Resultados, figuras 26, 29, 32 y 38) es constante, aunque se varíe la concentración del inductor. Sin embargo, en incubaciones realizadas durante el verano con PDGF (Resultados, figura 35) se

aprecia un fuerte descenso en la liberación de NO al emplear una concentración de 10 ng/ml.

Podemos decir que a la vista de los resultados obtenidos al realizar incubaciones con los inductores estudiados a distintas concentraciones durante el período estival, parece que la síntesis de NO está influenciada por otros factores como la variación estacional, la cual provoca una variabilidad significativa en la respuesta de los hemocitos. Estas afirmaciones se demuestran mediante el estudio de la expresión proteica de hemocitos incubados con los inductores (LPS, TNF- α , IL-2, PDGF y TGF- β_1), que refleja una diversidad en los patrones electroforéticos debida no tanto a la acción del inductor, sino más bien debido a la variación estacional (Resultados, figuras 27, 30, 33, 36 y 39).

La variación estacional es un concepto sugerido por diversos autores que está íntimamente relacionado con la fisiología del animal, apreciándose cambios en el contenido lipídico (Cancio *et al.*, 1999; Beliaeff *et al.*, 2002) y sobre la movilización de los hidratos de carbono (Zandee *et al.*, 1980; Gabbott, 1983; Robledo *et al.*, 1995). Según Ibarguren *et al.* (2000), el metabolismo de los hidratos de carbono de *M. galloprovincialis*, muestra dos fases separadas estacionalmente. La disponibilidad de alimento durante el verano, provoca acumulación de hidratos de carbono en el manto, concretamente glucógeno. En invierno, se acelera la glucólisis para poder obtener ácidos grasos, concretamente triglicéridos, los cuales aportan a los gametos más energía que los carbohidratos (Ibarguren *et al.*, 1990; Crespo y Espinosa, 1990; Alonso *et al.*, 2001).

En los años 60, Feng (1965) sugirió que la variación en el número de hemocitos de *Crassostrea virginica* era dependiente de la temperatura y de la cantidad de alimento disponible. A finales de los años 80, Fisher y Newell, indicaron la posibilidad de que el desarrollo de los gametos pudiese ser responsable de las variaciones en las proteínas de la hemolinfa a lo largo del año. En la década de los 90, se confirmó la dependencia de estos organismos de la

variabilidad de factores como la temperatura, salinidad y nutrientes de las rías (Santarém *et al.*, 1992; 1994).

En *Mytilus galloprovincialis* se estudió tanto el número de células totales por kg de mejillón como la proporción de los dos tipos celulares detectados en mejillón.

El recuento de células totales por kg de mejillón a lo largo de los cuatro años estudiados (Resultados, tabla 5) revela que el número total de células es mayor durante el verano que en invierno. Cabe destacar que tanto en invierno como en verano, el mayor recuento de células totales por kg de mejillón se aprecia durante el año 2002.

Por otra parte, el análisis de la proporción de los dos tipos celulares detectados en mejillón, revela durante el invierno una mayor presencia de células SH que de células RH (Resultados, tabla 6). Estos datos coinciden con los resultados obtenidos en otros moluscos bivalvos, en los que se aprecia que son los granulocitos las células más numerosas (Canesi *et al.*, 2002; Soares da Silva *et al.*, 2002). Durante el período estival, la proporción de células SH también supera a la de células RH, salvo en el caso del año 2001 (Resultados, tabla 6). En nuestro caso, se aprecia que durante el verano la proporción de células SH supera la de RH, siendo esta proporción de SH menor que la observada durante el invierno y, es en verano cuando se incrementa la morbilidad y mortalidad de los mejillones. La existencia de trabajos en los que se hace referencia a una posible degranulación en hemocitos de crustáceos como respuesta a infecciones de origen bacteriano (Lorenz *et al.*, 1999; 2001) hace pensar que en hemocitos de *M. galloprovincialis* pueda suceder algo similar. Se sabe también que durante el verano, los mejillones son más susceptibles de sufrir infecciones, debido al aumento de la temperatura, lo que parece influir en la permeabilidad de la membrana plasmática (Hernroth, 2002; 2003).

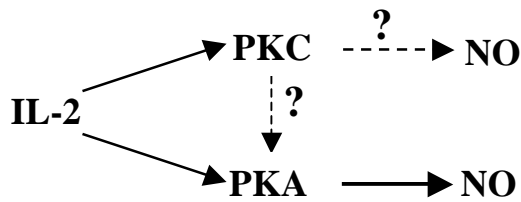
En trabajos desarrollados anteriormente en nuestro laboratorio, se identificaron dos proteína quinasas implicadas en multitud de rutas de señalización en eucariotas, PKA y PKC. La PKA se caracterizó a partir de dos tejidos de mejillón, el manto y el músculo aductor posterior (PAM), identificándose dos subunidades reguladoras (R_{myt1} y R_{myt2}) homólogas a las subunidades reguladoras RI y RII de mamíferos (Díaz-Enrich *et al.*, 2003; Bardales *et al.*, 2004). Mientras que en manto, pie, branquias, músculo aductor posterior, hepatopráncreas y hemocitos de mejillón se identificó una proteína de 105 kDa (*p105*) semejante a una isoforma de nPKC de mamíferos (Mercado *et al.*, 2002a; 2002b). El hecho de conocer la existencia de la PKA y de la PKC en *Mytilus galloprovincialis* Lmk., facilitó el estudio de la implicación de estas quinasas en la producción de óxido nítrico.

Para el estudio de las posibles rutas de transducción de señales implicadas en la síntesis de NO, se tomó como referencia el mejor inductor de la síntesis de óxido nítrico por hemocitos de mejillón, la IL-2.

Durante el invierno (Resultados, tabla 3), se observa que los hemocitos producen una elevada concentración de NO al ser incubadas las células con IL-2, pero esta producción se bloquea al emplear en las incubaciones un inhibidor de la PKA. Durante el verano, aunque la producción es menor que la observada durante el invierno, la incubación de hemocitos con un inhibidor de la PKA, supone un descenso en la síntesis de óxido nítrico, aunque no tan brusco como en invierno. Estos resultados, obtenidos durante el período invernal y estival, permiten relacionar a la PKA con la producción de NO.

El empleo de un inhibidor de la PKC (Resultados, tabla 4) provoca efectos diferentes a los observados en las incubaciones realizadas con un inhibidor de la PKA. Así, aunque durante el invierno se aprecia un descenso en la producción de NO al emplear un inhibidor de la PKC, resulta llamativo el hecho de que en verano aún incubando las células con este inhibidor, se produzca un incremento en

la síntesis de óxido nítrico. Estos resultados son contrarios a los obtenidos en líneas celulares de macrófagos de ratón, en los que la inhibición de la PKC induce a un descenso en la producción de óxido nítrico (Chio *et al.*, 2004). Estos datos sugieren que en la producción de NO por hemocitos de *Mytilus galloprovincialis*, la PKC podría estar implicada en al menos dos rutas.



Una relacionada directamente con la síntesis de óxido nítrico, dado que durante el invierno, se observa una disminución de la síntesis de óxido nítrico al inhibir la PKC. Y otra en la PKC podría regular la PKA, tal como sucede en células musculares de vertebrados (Graves *et al.*, 1996), puesto que durante el verano se incrementa la producción de NO, aunque esté inhibida la PKC.

A su vez, inmunodetecciones realizadas con anti-*p105* (Resultados, figura 40) revelan la presencia en citosol de una doble banda (105 y 108 kDa) para todos los casos estudiados, mientras que en membrana sólo se aprecia translocación de la enzima en células control. Estos datos confirmarían que la bisindolilmaleimida es un inhibidor de la actividad, pero no de la expresión de esta quinasa, dado que en citosol se observa una doble banda tanto en hemocitos incubados con el inhibidor como con la IL-2.

El estudio de la expresión de *p105* revela que durante el período invernal (Resultados, figura 44), LPS, TNF- α , IL-2, PDGF y TGF- β_1 no provocan cambios en la presencia de la enzima en la fracción citosólica, mientras que en membrana, no todos los inductores provocan la misma respuesta. Así, en hemocitos incubados

con IL-2 y TNF- α se aprecia una *downregulation* de la enzima. La respuesta obtenida con IL-2 concuerda con lo observado por Lu y Durkin (1997, 1999) en células T, los cuales afirman que la estimulación con este inductor no conduce a la translocación de la enzima a la membrana. Las incubaciones de hemocitos realizadas con LPS revelan la presencia de una sola banda (105 kDa), siendo esta banda la que se corresponde con la proteína fosforilada (Mercado *et al.*, 2002a; 2002b). Estos datos coinciden con los estudios realizados en macrófagos humanos, en donde se ha visto que el LPS induce la fosforilación de proteínas con residuos de serina/treonina, (Wright *et al.*, 1990; Weinstein *et al.*, 1991; Ulevitch y Tobias, 1995) y en el caso de mejillón *p105* también es fosforilada en residuos de serina, pero no de tirosina (Mercado *et al.*, 2002a). Estos resultados se oponen a los obtenidos por Cao *et al.* (2004b), en los que en hemocitos incubados con LPS, éste provoca el bloqueo de la translocación de la *p105* a la membrana. Es posible que estas diferencias observadas en el mismo tipo celular sean debidas a los distintos tiempos y concentraciones empleados.

Durante el período estival (Resultados, figura 45) en la fracción citosólica no se aprecian cambios en la presencia de *p105* al utilizar distintos inductores. Sin embargo, todos los inductores en este período, bloquean la translocación de la enzima a la membrana. Estos resultados coinciden con los observados al realizar incubaciones con IL-2 y las combinaciones de esta citoquina con los otros inductores estudiados (LPS, TNF- α , PDGF y TGF- β_1), en los que independientemente del período estudiado, se observa la misma respuesta que al utilizar cada uno de los inductores por separado (Resultados, figuras 46 y 47). Estos resultados parecen indicar que en hemocitos de mejillón, no se aprecia el efecto sinérgico característico de las citoquinas.

Las óxido nítrico sintetasas son las enzimas responsables de la síntesis de óxido nítrico en mamíferos (Stuehr, 1997; Palmer *et al.*, 1988). El empleo de un

anticuerpo monoclonal anti-iNOS humana en hemocitos de mejillón durante el período invernal (Resultados, figura 41), revela la presencia de tres bandas de 55, 99 y 130 kDa, siendo ésta última de tamaño similar al de iNOS de otras especies (Xie *et al.*, 1996). El empleo de LPS, IL-2 y PDGF no provocó cambios en la expresión de la banda de 130 kDa. Resulta interesante que a pesar de ser la IL-2 el mejor inductor de la síntesis de NO en hemocitos de *Mytilus galloprovincialis*, no provoqué cambios en la expresión de la isoforma inducible, oponiéndose a los estudios realizados por Ottaviani *et al.* (2004), en los que se afirma que la IL-2 induce la activación de la óxido nítrico sintetasa inducible. Sin embargo, durante el período estival (Resultados, figura 42) se observan cambios en la expresión de la banda de 130 kDa al realizar incubaciones de hemocitos con todos los inductores, excepto con el PDGF. Aunque en este período, sí se aprecian cambios en la expresión de iNOS al emplear IL-2 en las incubaciones, los hemocitos no responden sintetizando mayor cantidad de óxido nítrico.

Atendiendo a los resultados obtenidos durante el invierno y el verano, se puede afirmar que al incubar los hemocitos con distintos inductores, la producción de óxido nítrico aparentemente no es dependiente de los cambios en la expresión de la isoforma inducible.

En las inmunodetecciones realizadas con un anticuerpo monoclonal anti-eNOS bovina, durante el invierno (Resultados, figura 43), en citosol se detectó una única banda de 131 kDa, tamaño similar al de eNOS de otros organismos (Busse y Fleming, 1995). En todos los casos, se apreciaron cambios en la expresión de eNOS, aunque resulta llamativo el incremento de la intensidad de la banda de 131 kDa al ser los hemocitos incubados con IL-2 junto con LPS, PDGF o TGF- β_1 . Estos resultados son similares a los obtenidos con iNOS, dado que, aunque se aprecian cambios en la expresión de las enzimas, estos cambios no se corresponden con una mayor producción de NO.

En nuestro caso la isoforma endotelial sólo se detecta en el citosol en hemocitos capaces de liberar NO (Resultados, figura 43), comprobando la desaparición de eNOS en citosol en hemocitos incapaces de sintetizar NO. Al igual que sucede en otras especies, la eNOS de mejillón en respuesta a determinados estímulos se detecta solamente en citosol, apoyándose este resultado en afirmaciones de varios autores que sostienen que esta isoforma constitutiva puede ser activada en respuesta a estímulos causados por estrés, citoquinas y determinadas hormonas e inducir de esta forma en distintos tipos celulares la síntesis de óxido nítrico (Kopeck y Carroll, 2000; Fleming y Busse, 2003; Connelly *et al.*, 2005). La existencia de estudios realizados en distintos tipos celulares confirman que en respuesta a una estimulación, se produce la depalmitoilación de la eNOS, la cual se disocia de la membrana y puede translocarse al citosol (Robinson *et al.*, 1995; Kauser y Rubanyi, 1997; Papapetropoulos *et al.*, 1997; Prabhakar *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2001), aunque la translocación de esta enzima ha sido motivo de controversia en los últimos años (Sowa *et al.*, 1999).

En hemocitos de *M. galloprovincialis*, creemos que al igual que sucede en ratones, la isoforma endotelial desempeña una función pro-inflamatoria en respuesta a distintos estímulos. Mediante estudios realizados *in vivo* durante procesos de septicemia, el NO sintetizado constitutivamente por la eNOS de ratón actúa regulando la expresión y la activación de iNOS, la cual puede sintetizar mayores concentraciones de óxido nítrico (Connelly *et al.*, 2005).

Durante los años 2003 y 2004, curiosamente años posteriores a uno de los mayores desastres ecológicos ocurridos en las costas gallegas, se aprecian cambios en el comportamiento de los hemocitos en relación al observado durante los dos años anteriores, en los que se detectó producción de óxido nítrico. Diversos estudios realizados con *M. galloprovincialis*, han confirmado que la existencia de determinados aceites y/o hidrocarburos en agua de mar provocan cambios en la

expresión de determinadas proteínas en esta especie (Middaugh *et al.*, 1996, 1998; Shelton *et al.*, 1999; Snyder *et al.*, 2001) y por otra parte se ha comprobado que la presencia de p.p.m. de hidrocarburos en agua marina, provoca la inhibición del desarrollo embrionario de varias especies de invertebrados, como las estrellas de mar (Spies y Davis, 1982).

Además de comprobar que la producción de óxido nítrico se anula durante estos años, se observa un cambio en la expresión proteica de los hemocitos (Resultados, figuras 48 y 49), en las inmunodetecciones realizadas con anti-iNOS humana y anti-eNOS bovina y se aprecia apoptosis en hemocitos obtenidos durante este bienio.

En relación a la expresión proteica resulta extraña la aparición de una única banda de 52 kDa en proteínas de membrana de hemocitos incubados con los inductores estudiados (Resultados, figura 49), resultados que contrastan con los obtenidos por Cao (2002) en los que se apreciaba un gran número de bandas en el perfil proteico de mejillón.

En las inmunodetecciones realizadas con anti-iNOS humana y anti-eNOS bovina, cabe destacar que durante este período en el que no se apreció producción de óxido nítrico por hemocitos incubados con LPS, TNF- α , IL-2, PDGF y TGF- β_1 , no se detectó ninguna de las dos isoformas para ninguno de los casos, lo cual nos sugiere que estas dos isoformas podrían estar implicadas en la síntesis de NO en hemocitos de *M. galloprovincialis*.

Es también durante los años 2003 y 2004 cuando en *Mytilus galloprovincialis* se aprecia inducción de apoptosis al ser los hemocitos incubados con CHX, TGF- β_1 y TNF- α y a diferencia de los resultados obtenidos con hepatocitos (Oberhammer *et al.*, 1992; Blom *et al.*, 1999; Shima *et al.*, 1999), en hemocitos las concentraciones y los tiempos de incubación empleados fueron menores (Resultados, tabla 7).

El TGF- β_1 dependiendo del tipo celular sobre el que actúe presenta una dualidad de respuestas (Sánchez-Capelo, 2005), una anti-apoptótica como la observada en microglía (Schlapbach *et al.*, 2000) y osteoblastos (Sowa *et al.*, 2003) y otra respuesta pro-apoptótica observada en hepatocitos (Oberhammer *et al.*, 1992; Shima *et al.*, 1999) y linfocitos B y T (Lomo *et al.*, 1995; Chaouchi *et al.*, 1995; Douglas *et al.*, 1997). En el caso de hemocitos de *Mytilus galloprovincialis*, se aprecia que el empleo de TGF- β_1 induce apoptosis (Resultados, figura 51), a diferencia de lo observado por Ottaviani *et al.* (2004), que afirman que la administración exógena de TGF- β_1 tiene un efecto anti-apoptótico en hemocitos de líneas celulares de insectos y de *M.galloprovincialis*, al activarse la PI(3)K, PKA y PKC.

Diversos autores sugieren la capacidad del TNF- α para participar tanto en procesos apoptóticos como en procesos necróticos (Rothe *et al.*, 1992; Tracey y Cerami, 1993; Barsacchi *et al.*, 2002; Hughes *et al.*, 2005). Estos trabajos apoyan los resultados obtenidos en hemocitos, ya que en las incubaciones realizadas con TNF- α durante el invierno, esta citoquina provoca un efecto apoptótico, mientras que durante el verano y en las mismas condiciones que en el período invernal, provoca necrosis (Resultados, figura 52).

Por otra parte, TNF- α y TGF- β_1 , no sólo provocan apoptosis en hemocitos, sino que en las incubaciones realizadas con estos dos inductores, se observa un descenso en la expresión de iNOS (Resultados, figuras 41y 42).

1. El ALS suplementado mantiene la viabilidad de hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. durante largos períodos de tiempo y no interfiere con los reactivos del método de Griess empleado para la cuantificación del óxido nítrico.
2. De todos los supuestos inductores de la respuesta inmune estudiados, solamente la IL-2 provoca notables incrementos de la producción de óxido nítrico en hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Sorprendentemente, el LPS, conocido estimulador de la síntesis de NO en células de vertebrados, no provoca en hemocitos la inducción de dicha síntesis.
3. La inhibición de la producción de NO al emplear el inhibidor específico H89, sugiere la implicación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) en la ruta de señalización empleada por la IL-2 para la síntesis de NO.
4. La implicación de la proteína quinasa dependiente de calcio (PKC) en las rutas de transducción de señales inducidas por la IL-2, parece estar condicionada por factores ambientales, puesto que se aprecian diferentes respuestas en la síntesis de NO a lo largo del año.

5. Durante el invierno, la IL-2 y el TNF- α , provocan un incremento en la expresión de *p105*, mientras que el LPS, induce la fosforilación de esta quinasa detectada en *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Sin embargo, durante el verano, los inductores estudiados (LPS, IL-2, TNF- α , PDGF y TGF- β_1), bloquean la translocación de *p105* a la membrana y por lo tanto, la activación de la enzima.
6. En hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. han sido detectadas dos proteínas, que fueron reconocidas por anticuerpos monoclonales anti-iNOS humana y anti-eNOS bovina; siendo la producción de óxido nítrico, aparentemente independiente de cambios en la expresión de iNOS y de eNOS.
7. En hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. y a diferencia de lo observado en células de vertebrados, la isoforma endotelial sólo se detecta en citosol, nunca en membrana.
8. Durante los años de estudio de la respuesta inmune de *Mytilus galloprovincialis* Lmk., se valoró la proporción de los tipos celulares, apreciándose que la proporción de células SH es menor durante el verano; época en la que se aprecia una mayor producción basal de óxido nítrico.

9. La pauta de comportamiento de hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* Lmk., se interrumpió durante los años 2003 y 2004 por causas desconocidas.
10. Durante los años 2003 y 2004 se aprecia una caída drástica de la síntesis de óxido nítrico, confirmada por la ausencia de las dos isoformas (iNOS y eNOS) detectadas previamente.
11. La inducción de apoptosis en hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. sólo se aprecia empleando CHX, TNF- α y TGF- β 1 en el período comprendido entre 2003 y 2004.
12. El TNF- α y el TGF- β 1 originan una dualidad de respuestas en hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* Lmk., así durante los años 2001 y 2002, provocan un descenso de la expresión de iNOS, mientras que en los años 2003 y 2004 inducen apoptosis.

Abu- Soud, H.M., Wang, J., Rousseau, D.L., Fukuto, J.M., Ignarro, L.J. y Stuehr, D.J. (1995). Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis. *J. Biol. Chem.* **270**, 22997-23006.

Abu- Soud, H.M., Yoho, L.L. y Stuehr, D.J. (1994). Calmodulin controls neuronal nitric oxide synthase by a dual mechanism. *J. Biol. Chem.* **269**, 32047-32050.

Aktan, F. (2004). iNOS mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences* **75**, 639-653.

Albakri, Q.A. y Stuehr, D. (1996). Intracellular assembly of inducible NO synthase is limited by nitric oxide mediated changes in heme insertion and availability. *J. Biol. Chem.* **271**, 5414-5421.

Alican, I. y Kubes, P.A. (1996). A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am. J. Physiol* **33**, 225-237.

Alonso, A., Suarez, P., Alvarez, C., San Juan, F. y Molist, P. (2001). Structural study of a possible neoplasia detected in *Mytilus galloprovincialis* collected from the Ria of Vigo (NW Spain). *Dis. Aquat. Organ.* **47**, 73-79.

Alley, E.W., Murphy, W.J. y Russell, S.W. (1995). A classical enhancer element responsive to both lipopolysaccharide and interferon gamma augments induction of the iNOS gene in mouse macrophages. *Gene* **158**, 247-251.

Aoyagi, M., Arvai, A.S., Trainer, J.A. y Getzoff, D. (2003). Structural basis for endothelial nitric oxide synthase binding to calmodulin. *EMBO J.* **4**, 766-775.

Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. y Yokota, T. (1990). Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 783-836.

Arends, M.J. y Wyllie, A.H. (1991). Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol.* **32**, 223-254.

Arnal, J.F., Warin, L. y Michel, J.B. (1992). Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J. Clin Invest.* **90**, 647-652.

Arumugan, M., Romestamd, B. y Torreilles, J. (2000a). Nitrite released haemocytes from *Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea gigas* and *Ruditapes decussatus* upon stimulation with phorbol myristate acetate. *Aquat. Living Resour.* **13**, 173-177.

Arumugan, M., Romestamd, B., Torreilles, J. y Roch, P. (2000b). In vitro of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 513-519.

Asano, K., Chee, C.B.E., Gatton, B., Lilly, C.M., Gerard, C., Drazen, J.M. y Stamler, J.S. (1994). Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation and activity in human lung epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 10089-10093.

Ashkenazi, A. y Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.

Azzi, A., Boscoboinik, D. y Hensey, C. (1992). The protein kinase C family. *Eur. J. Biochem.* **208**, 547-557.

Bacskai, B.J., Hochmer, B., Mahaut-Smith, M., Adams, S.R., Kaang, B.K., Kandel, E.R. y Tsien, R.Y. (1993). Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science* **260**, 222-226.

Badovinac, V., Mostarica-Stojkovic, M., Dinarello, C.A. y Stosic-Grujicic, S. (1998). Interleukin-1 receptor antagonist suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in rats by influencing the activation and proliferation of encephalitogenic cells. *J. Neuroimmunol.* **85**, 87-95.

Baek, K.J., Thiel, B.A., Lucas, S. y Stuehr, D.J. (1993). Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J. Biol. Chem.* **268**, 21120-21129.

Baldwin, A.S. (1996). The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 649-681.

Balendran, A., Casamayor, A., Deak, M., Paterson, A., Gaffney, P., Currie, R., Downes, C.P. y Alessi, D.R. (1999). PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Curr Biol.* **9**, 393-404.

Barcia, R., Cao, A., Arbeteta, J. y Ramos-Martínez, J.I. (1999). The IL-2 receptor in hemocytes of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *IUBMB Life* **48**, 419-423.

Barcia, R., Ibarguren, I. y Ramos-Martínez, J.I. (1992). Fructose-1,6-bisphosphatase in mantle of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. III: Seasonal variation of enzymatic activity. *Comp. Biochem. Physiol.* **102**, 845-848.

Bardales, J.R., Díaz-Enrich, M.J., Ibarguren, I. y Villamarín, J.A. (2004). Isoforms of cAMP dependent protein kinase in the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*: activation by cyclic nucleotides and effect of temperature. *Arch. Biochem. Biophys.* **432**, 71-78.

Barsacchi, R., Perrotta, C., Bulotta, S., Moncada, S., Borgese, N. y Clementi, E., (2002). Activation of endothelial nitric oxide synthase by tumor necrosis factor α : A novel pathway involving sequential activation of neutral sphingomyelinase, phosphatidylinositol-3' kinase and Akt. *Mol. Pharmacol.* **63**, 886-895.

Bauchau, A.G. (1981). In: *Invertebrate Blood Cells*, volumen 2. Academic Press, New York. pp.385-420.

Baeuerle, P.A. y Baltimore, D. (1996). NFκB: ten years after. *Cell* **87**, 13-20.

Beckman, J. S. (1991). The double edged role of nitric oxide in brain function and superoxide mediated injury. *J.Dev. Physiol.* **15**, 53-59.

Behn-Krappa, A. y Newton, A.C. (1999). The hydrophobic phosphorylation motif of conventional protein kinase C is regulated by autophosphorylation. *Curr. Biol.* **9**, 728-737.

Beliaeff, B., O'Connor, T.P., Munsch, C., Raffin, B. y Claisse, D. (2002). Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in mussels and oysters in France and in the United States. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**, 1783-1787.

Belvisi, M.G., Stretton, C.D., Yacoub, M. y Barnes, P.J. (1992) Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. *Eur. J. Pharmacol.* **210**, 221-222.

Berridge, M.J. e Irvine, R.F. (1984). Inositol trisphosphate a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**, 315-325.

Billecke, S.S., Bender, A.T., Kanelakis, K.C., Murphy, P.J., Lowe, E.R., Kamada, Y., Pratt, W.B. y Osawa, Y. (2002). HSP90 is required for heme binding and activation of APO neuronal nitric oxide synthase: geldanamycin mediated oxidant generation is unrelated to any action of HSP90. *J. Biol. Chem.* **277**, 20504-20509.

Bissonnette, E.Y., Hogaboam, C.M., Wallace, J.L. y Befus, A.D. (1991). Potentiation of tumor necrosis factor-α-mediated cytotoxicity of mast cells by their production of nitric oxide. *J. Immunol.* **147**, 3060-3065.

Blach-Olszewska, Z. (2005). Innate immunity: cells, receptors and signaling pathways. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **53**, 245-253.

Blom, W.M., de Bont, H.J., Meijerman, I., Mulder, G.J. y Nagelkerke, J.F. (1999). Prevention of cycloheximide induced apoptosis in hepatocytes by adenosine and by caspase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **58**, 1891-1898.

Boissel, J.P., Schwarz, P.M. y Forstermann, V. (1998). Neuronal-type NO synthase: Transcript diversity and expressional regulation. *Nitric Oxide*, **2** 337-349.

Boland, M.P. (2001). DNA damage signalling and NF-kappaB: implications for survival and death in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 674-678.

Boo, Y.C. y Jo, H. (2003). Flow depend regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **285**, 499-508.

Boo, Y.C., Sorescu, G., Boyd, N., Shiojima, I., Walsh, K., Du, J., y Jo, H., (2002). Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent. *J. Biol. Chem.* **277**, 3388-3396.

Boutin, J.A. (1997). Myristoylation. *Cell. Signal.* **9**, 15-35.

Bred, D.S. y Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 682-685.

Bredt, D.S. y Snyder, S.H. (1994). Nitric oxide: physiologic messenger molecule. *Ann. Rev. Biochem.* **63**, 175-195.

Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R., Snuyder, S.H. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **371**, 714-718.

Brose, N. y Rosenmund, C. (2002). Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J. Cell. Sci.* **115**, 4399-4411.

Brouet, A., Sonveaux, P., Dessy, C., Balligand, J-L. y Feron, O. (2001). Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺ dependent to the late phosphorylation dependent activation of the endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem.* **276**, 32663-32669.

Brusca, R.C. y Brusca, G.J. (2005). *Filo Moluscos (Mollusca)*. En: Invertebrados, 2ª Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, pp 757-833.

Buchner, K., Otto, H., Hilbert, R., Lindschau, C., Haller, H. y Hucho, F. (1992). Properties of protein kinase C associated with nuclear membranes. *Biochem. J.* **286**, 369-375.

Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.L. y Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects: Structures and function. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 329-344.

Busconi, L y Michel, T. (1993). Endothelial nitric oxide synthase: N terminal myristoylation determines subcelular localization. *J. Biol. Chem.* **268**, 8410-8413.

Busse, R. y Fleming, I. (1995). Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Annu. Med.* **27**, 331-340.

Butt, E., Bernhardt, M., Smolenski, A., Kotsonis, P., Frohlich, L.G., Sickmann, A., Cancio, I., Ibabe, A. y Cajaraville, M.P. (2000). Seasonal variation of peroxisomal enzyme activities and peroxisomal structure in mussels *Mytilus galloprovincialis* and its relationship with the lipid content. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **123**, 135-144.

Cancio, I., Ibabe, A. y Cajaraville, M.P. (1999). Seasonal variation of peroxisomal enzyme activities and peroxisomal structure in mussels *Mytilus galloprovincialis* and its relationship with the lipid content. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **123**, 135-144.

Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M. y Pruzzo, C. (2002). Bacteria hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Tech.* **57**, 469-476.

Cao, A. (2002). Aportaciones al estudio de la respuesta inmune en hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela (USC).

Cao, A., Mercado, L.A., Ramos, J.I. y Barcia, R. (2003). . The primary cultures of hemocytes from the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: The expression of the IL-2R α subunit. *Aquaculture* **216**, 1-8.

Cao, A., Ramos-Martínez, J.I. y Barcia, R. (2004a). In vitro effects of LPS, IL-2, PDGF and CRF on hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Fish Shellfish Immunol.* **16**, 215-225.

Cao, A., Ramos-Martínez, J.I. y Barcia, R. (2004b). Implication of PKA and PKC in the activation of the hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. By LPS and IL-2. *Mol. Immunol.* **41**, 45-52.

Cao, J., Fernández, M., Ramos-Martínez, J.I. y Villamarín, J.A. (1996). Identification of RII-binding proteínas in the mollusc *Mytilus galloprovincialis*. *FEBS Lett.* **382**, 93-96.

Cao, J., Ramos-Martínez, J.I. y Villamarín, J.A. (1995). Characterization of a cAMP binding protein from the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem.* **232**, 664-670.

Carballal, M.J., López, M.C., Azevedo, C. y Villalba, A. (1997). Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Org.* **29**, 127-135.

Carton, Y. y Nappi, A.J. (1997). Drosophila cellular immunity against parasitoids. *Parasitol. Today* **13**, 218-227.

Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Bio. Chem.* **257**, 7847-7851.

Celada, A. y Nathan, C. (1994). Macrophage activation revisited. *Immunol. Today* **15**, 100-102.

Coghlan, M., Chon, M. y Carpenter, C. (2000). Atypical protein kinase C lambda and zeta associate with the GTP-binding protein Cdc42 and mediate stress fiber loss. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2880-2889.

Cohen, G.M., Sun, X-M., Fearnhead, H., MacFarlane, M., Brown, D.G., Snowden, R.T. y Dinsdate, D. (1994). Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J. Immunol.* **153**, 507-516.

Connelly, L., Madhani, M. y Hobbs, A. J. (2005). Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) knockout mice: a pro-inflammatory role for eNOS derived NO in vivo. *J. Biol. Chem.* **280**, 10040-10046.

Conte, A. y Ottaviani, E. (1995). Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. *FEBS Letters*, **365**, 120-124.

Coussens, L., Parker, P., Rhee, L., Yang-Feng, T., Chen, E., Waterfield, M., Francke, U. y Ullrich, A. (1986). Multiple distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* **233**, 859-866.

Crespo, C. y Espinosa, J. (1990). Nutrient storage cells from mantle tissue of *Mytilus galloprovincialis*: glucose release and glycogen content. *Rev. Esp. Fisiol.* **46**, 241-246.

Cui, S., Reichner, J.S., Mateo, R.B. y Albina, J.E. (1994). Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide dependent or independent mechanisms. *Cancer Res.* **54**, 2462-2467.

Channon, K.M. (2004). Tetrahydrobiopterin. Regulator of endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Trends. Cardiovasc. Med.* **14**, 323-327.

Chaouchi, N., Arvanitakis, L., Auffredou, M.T., Blanchard, D.A., Vazquez, A. y Sharma, S. (1995). Characterization of transforming growth factor β 1 induced apoptosis in human B cells and lymphoma B cell lines. *Oncogene* **11**, 1615-1622.

Chauhan, V., Chauhan, A., Deshumkh, D. y Brockerhoff, H. (1990). Lipid activators of protein kinase C. *Life Sci.* **47**, 981-986.

Chen, C.C., Chiu, K.T., Sun Y.T. y Chen, W.C. (1999). Role of the cyclic AMP protein kinase A pathway in lipopolysaccharide induce nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. Involvement of cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* **274**, 1559-1564.

Chen, P-F., Tsai, A-L, Berka, V. y Wu, K.K. (1996). Endothelial nitric oxide synthase. Evidence for bidomain structure and successful reconstitution of catalytic activity from two separate domains generated by a baculovirus expression system. *J. Biol. Chem.* **271**, 14631-14635.

Chen, Z.T., Li, S.L., Cai, E.Q., Wu, W.L., Jin, J.S. y Zhu, B. (2003). LPS induces pulmonary intravascular macrophages producing inflammatory mediators via activating NF-kappaB. *J. Cell Biochem.* **89**, 1206-1214.

Chin, D. y Means, A.R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends. Cell. Biol.* **10**, 322-328.

Chio, C-C., Chang, Y-H., Hsu, Y-W., Chi, K-H. y Lin, W-W. (2004). PKA dependent activation of PKC, p38 MAPK and IKK in macrophage: implication in the induction of inducible nitric oxide synthase and inteleukin 6 by dibutyryl cAMP. *Cell. Sign.* **16**, 565-575.

Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Ionue, T., Naito, K., Tashioka, T y Hidaka, H. (1990). Inhibition of forskolin induced neurite out growth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP dependent protein kinase, N-[2(p-bromociannamylamino) ethyl]-5-isoquinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 5267-5272.

Cho, H. J., Martin, E., Xie, Q-W., Sassa, S. y Nathan, C. (1995). Inducible oxide nitric synthase: identification of amino acid residues essential for dimerization and binding of tetrahydrobiopterin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11514-11518.

Cho, H. J., Xie, Q-W., Calaycay, J. Mumford, R.A., Swinderek, K.M., Lee, T.D. y Nathan, C. (1992). Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.* **176**, 599-604.

Chow, M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L., Lee, M., Chen, C., Newton, A., Schaffhausen, B. y Toker, A. (1998). Regulation of protein kinase C- ζ by PI 3-kinase – PDK-1-Akt/PKB signalling pathway. *Curr. Biol.* **8**, 1069-1077.

Christopherson, J.A. (1996). The captive medical malpractice insurance company alternative. *Ann. Health. Law.* **5**, 121-143.

Chyczewska, E. y Mroz, R.M. (1997). Cytokines and cancer. *Rocz. Akad. Med. Białymst.* **42**, 8-22.

- Daniel, P.B. (1998). Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu. Rev. Nutr.* **18**, 353-383.
- Davis, M.E., Cai, H., Drummond, G.R. y Harrison, D.G. (2001). Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ. Res.* **89**, 1073-1080.
- Díaz-Enrich, M.J., Ibarguren, I., Hellman, U. y Villamarín, J.A. (2003). Characterization of a type I regulatory subunit of cAMP dependent protein kinase from the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **416**, 119-127.
- Diehl, R., Mateo, J.M. y Urbano, P. (1985). *El suelo, medio biológico*. En: Fitotecnia general, 2ª Edición. Ed. Mundi-Prensa. Madrid pp. 213-219.
- Dimmeler, S. y Zeiher, A.M. (1997). Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide* **4**, 275-281.
- Dimmeler, S., Ankarcona, M., Nicotera, P. y Brune, B. (1997). Exogenous nitric oxide (NO): Generation of IL-1 β induced intracellular NO production stimulates inhibitory auto ADP ribosylation of glyceraldehyal-3-phospate dehydrogenase in rIN m5F cells. *J. Immunol.* **150**, 2964-2971.
- Douglas, R.S., Capocasale, R.J., Lamb, R.J., Nowel, P.C. y Moore, J.S. (1997). Chronic lymphocytic leukaemia B cells are resistant to the apoptotic effects of transforming growth factor β -1. *Blood* **89**, 941-947.
- Dunphy, J.T. y Linder, M.E. (1998). Signaling functions of protein palmitoylation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1436, 245-261.

Durán, C., Acuña, R. y Santiago, J. (1990). El Mejillón. Biología, Cultivo y Comercialización. Centro de Investigaciones Submarinas (CIS). Fundación Caixa Galicia.

Dutil, E., Toker, A. y Newton, A. (1998). Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr. Biol.* **8**, 1366-1375.

Dutil, E.M. y Newton, A.C. (2000). Dual role of pseudosubstrate in the coordinated regulation of protein kinase C by phosphorylation and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* **275**, 10697-106701.

Dyrynda, E.A., Pipe, R.K. y Ratcliffe, N.A. (1997). Sub-populations of haemocyte in the adult and developing marine mussel, *Mytilus edulis*, identified by use of monoclonal antibodies. *Cell Tissue Res.* **289**, 527-536.

Eberhardt, W., Pluss, C., Hummel, R. y Pfeilschifter, J. (1998). Molecular mechanism of inducible nitric oxide synthase gene expression by IL-1 beta and cAMP in rat mesangial cells. *J. Immunol.* **160**, 4961-4969.

Ellis, R.E., Yuan, J. y Horvitz, H.R. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu.Rev. Cell. Biol.* **7**, 663-698.

Engstrom, Y. (1999). Induction and regulation of antimicrobial peptides in *Drosophila*. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 345-358.

Eun, J.S., Suh, Y.H., Kim, D.K. y Jeon, H. (2000). Regulation of cytokine production by exogenous nitric oxide in murine splenocyte and peritoneal macrophage. *Arch. Pharm. Res* **23**, 531-534.

Fabregat, I. y Fernández, M. (2002). Acción dual del TGF-beta: Supresor de tumores y activador de la progresión tumoral. *Schironia* **1**, 47-50.

Farazo, T.A., Waksman, G. y Gordon, J.I. (2001). The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J. Biol. Chem.* **276**, 39501-39504.

Feng, S. Y. (1965). Heart rate and leucocyte circulation in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Biol. Bull.* **128**, 198-210.

Feng, S.Y., Fene, J.S. y Yasmasn, T. (1977). Roles of *Mytilus coruscus* and *Crassostrea gigas* blood celsss in defense and nutrition. *Comp. Pathobiol.* **3**, 31-61.

Fisher, W.S. y Newell, R.I.E. (1986). Seasonal and environmental variations in proteins and carbohydrates levels in the hemolymph from American oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin). *Comp. Biochem. Physiol.* **85A**, 365-372.

Fleming, I. y Busse, R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **284**, R1-R12.

Fleming, W. (1878). Veber die Blutzellen der Acephlen und bermerkunges iiber cleren Blutbath. *Arch. Mikro. Anat.* **15**, 243-252.

Forslund, T. y Sundquist, T. (1997). Nitric oxide releasing particles inhibit phagocytosis in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 492-495.

Franchini, A., Conte, A. y Ottaviani, E. (1995). Nitric oxide: An ancestral immunocyte effector molecule. *Adv. Neuroimmunol.* **5**, 463-478.

Francis, J.M., Heyworth, C.M., Spooncer, E., Pierce, A., Dexter, T.M. y Whetton, A.D. (2000). Transforming growth factor β 1 induces apoptosis independently of p53 and selectively reduces expression of Bcl-2 in multipotent hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 39137-39145.

Francis, S.H. y Corbin, J.D. (1994). Structure and function of cyclic nucleotide dependt protein kinases. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 237-272.

Franke, T.F., Kaplan, D.R. y Cantley, L.C. (1997). PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* **88**, 435-437.

Friebel, B. y Renwrantz, L. (1995). Application of density gradient centrifugation for separation of eosinophilic and basophilic haemocytes from *Mytilus edulis* and characterization of both cell groups. *Comp. Biochem. Physiol.* **112**, 81-90.

Fulton, D., Fontana, J., Sowa, G., Gratton, J.P., Lin, M., Li, K.X., Michel, B., Kemp, B. E., Rodman, D. y Sessa, W.C. (2002). Localization of endothelial nitric oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *J. Biol. Chem.* **277**, 4277-4284.

Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, T., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A. y Sessa, W.C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**,597-601.

Gabbott, P.A. (1983). Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. En: Hochachka, P. W., *The Mollusca*, vol 2. Academic Press, New York, pp. 165-218.

Galbiati, F., Volonte, D., Meani, D., Milligan, G., Lublin, D.M., Lisanti, M.P., y Parenti, M. (1999). The dually acylated NH2 terminal domain of gilalpha is sufficient to target a green fluorescent protein reporter to caveolin enriched plasma membrane domains. Palmitoylation of caveolin-1 is required for the dually acylated G-protein alpha subunits in vivo. *J. Cell. Biol.* **274**, 5843-5850.910-3917.

Galea, E. y Feinstein, D.L. (1999). Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic. *FASEB J.* **13**, 2125-2137.

Gallis, B., Corthals, G. L., Goodlett, D.R., Ueba, H., Kim, f., Presnell, S.R., Figeys, D., Harrison, D.G., Berk, B.C., Aebersold, R., y Corson, M.A. (1999). Identification of flow dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation sites by mass spectrometry and regulation of phosphorylation and nitric oxide production by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *J. Biol. Chem.* **274**, 30101-30108.

García-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A., y Sessa, W.C. (1998). Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* **392**, 821-824.

Garthwaite, J. (1991). Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends. Neurosci.* **14**, 60-67.

Gekeler, V., Boer, R., Uberall, F., Ise, W., Schubert, C., Utz, I., Hofmann, J., Sanders, K.H., Schachtele, C., Klemm, K. y Grunicke, H. (1996). Effects of the selective bisindolylmaleimide protein kinase C inhibitor GF 109203X on p-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Br. J. Cancer* **74**, 897-905.

Genaro, A.M., Hortelano, S., Alvarez, A., Martínez, C. y Boscá, L. (1995). Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanism involving sustained Bcl-2 levels. *J. Clin. Invest.* **95**, 1884-1890.

Ghosh, D.K. y Stuehr, D. J. (1995). Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head to head subunit interaction. *Biochemistry* **34**, 801-807.

Giovanelli, J., Campos, K.L. y Kaufman, S. (1991). Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase, does not function as a reactant in the oxigenation of arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7091-7095.

Glinski, Z. y Jarosz, J. (1997). Molluscan immune defenses. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* (Warz) **45**, 149-155.

Gobert, A.P., Wilson, K.T. y Martin, C. (2005). Cellular responses to attaching and effacing bacteria: activation and implication of the innate immune system. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **53**, 234-244.

Gómez, J., González, A., Martínez, C. y Rebollo, A. (1998). IL-2 induced cellular events. *Crit. Rev. Immunol.* **18**, 185-220.

Gosgnach, W., Challah, M., Coulet, F., Michel, J.B. y Battle, T. (2000). Shear stress induces angiotensin converting enzyme expression in cultured smooth muscle cells: possible involvement of bFGF. *Cardiovas. Res.* **45**, 486-492.

Golstein, P., Marguet, D. y Depraetere, V. (1995). Homology between reaper and the cell death domains of Fas and TNFR1. *Cell* **81**, 185-186.

Golstein, P., Ojcius, D.M. y Young, J.D. (1991). Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.* **121**, 29-65.

Goss, V.L., Hocevar, B.A., Thompson, L.J., Stratton, C.A., Burns, D.J. y Fields, A.P. (1994). Identification of nuclear beta II protein kinase C as a mitotic lamin kinase. *J. Biol. Chem.* **269**, 19074-19080.

Gourdon, I., Guerin, M.C., Torreilles, J. y Roch, P. (2001). Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide* **5**, 1-6.

Granath, W.O.Jr., Connors, V. y Tartelon, R. (1994). Interleukine-1 activity in hemolymph from strains of the snail *Biomphalaria glabata* varying in susceptibility to the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*: presence, differential expresión and biological function. *Cytokines* **6**, 21-27.

Gratton, J.P., Fontana, J., O'Connor, D.S., García-Cardena, G., McCabe, T.J. y Sessa, W.C. (2000). Reconstitution of an endothelial nitric oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin. *J. Biol. Chem.* **275**, 22268-22272.

Graves, L.M., Bornfeldt, K.E., Sidhu, J.S., Argast, G.M., Raines, E.W., Ross, R., Leslie, C.C. y Krebs, E.G. (1996). Platelet derived growth factor stimulates protein kinase A through a mitogen activated protein kinase dependent pathway in human arterial smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 505-511.

Greenburg, S.S., Ouyang, K., Zhao, X. y Giles, T.D. (1998). Human and rat neutrophils constitutively express neural nitric oxide synthase mRNA. *Nitric Oxide* **2**, 203-212.

Griffith, O.W. y Stuehr, D.J. (1995). Nitric oxide synthase: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 707-736.

Griscavage, J.M., Fukuto, J.M., Komori, Y. e Ignarro, L.J. (1994). Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthase by interacting with the heme prosthetic group. Role of tetrahydrobiopterin in modulating the inhibitory action of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**, 21644-21649.

Gupta, S. (2000). Molecular steps of cell suicide: an insight into immune senescence. *J Clin. Immunol.* **20**, 229-239.

Habener, J.F. (1995). *Cyclic AMP second messenger signaling pathway*. In: Endocrinology, 3 rd Ed (DeGroot, L. J., ed) W. B. Saunders, Philadelphia, pp. 77-92.

Hale, A.J., Smith, C.A., Sutherland, L.C., Stoneman, V.E.A., Longthorne, V.L., Culhane, A.C. y Williams, G.T. (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Euro. J. Biochem.* **236**, 1-6.

Hall, A.V., Antonion, K., Wang, Y., Cheung, A.H., Arbus, A. M., Olson, S.L., Lu, W.C., Kan, C.L. y Marsden, P.A. (1994). Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gen (NOS1). *J. Biol. Chem.* **269**, 33082-33090.

Hanks, S. y Hunter, T. (1995). The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**, 576-596.

Harootunian, A.T., Adans, S.R., Wen, W., Meinkoth, J.L., Taylor, S.S. y Tsien, R.Y. (1993). Movement of the free catalytic subunit of cAMP dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion. *Mol. Biol. Cell.* **4**, 993-1002.

Hausladen, A., Privalle, C.T., Keng, T., De Angelo, J. y Stamler, J.S. (1996). Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* **86**, 719-729.

Haynes, M.P., Sinha, D., Russell, K. S., Collinge, M., Fulton, D., Morales-Ruiz, M., Sessa, W. C. y Bender, J.R. (2000). Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ. Res.* **87**, 677-682.

Hernroth, B. (2002). The influence of temperature and dose on antibacterial peptide response against lipopolysaccharide in the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Fish Selfish Immunol.* **14**, 25-37.

Hernroth, B. (2003). Factors influencing bactericidal activity of blue mussel (*Mytilus edulis*) haemocytes against *Salmonella typhimurium*. *Fish Selfish Immunol.* **14**, 93-104.

Hevel, J.M., White, K. A. y Marletta, M.A. (1991). Purification of the inducible murine macrophage oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J. Biol. Chem.* **266**, 22789-22791.

Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Vavrin, Z. y Rachlin, E.M. (1988). Nitric oxide: A cytotoxic activate macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 87-94.

Hisamoto, K., Ohmichi, M., Kurachi, H., Hayakawa, J., Kanda, Y., Nishio, Y., Adachi, K., Tasaka, K., Miyoshi, E., Fujiwara, N., Taniguchi, N. y Murata, Y. (2001). Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 3459-3467.

Hocevar, B.A., Bums, D.J. y Fields, A.P. (1993). Identification of protein kinase C (PKC) phosphorylation sites on human lamin B. Potential role of PKC in nuclear lamina structural dynamics. *J. Biol. Chem.* **268**, 7545-752.

Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Jr. y Ezekowitz, R.A.B. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-1318.

Hommel, U., Zurini, M. y Luyten, M. (1994). Solution structure of a cysteine rich domain of rat protein kinase C. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 383-387.

Hsu, H., Huang, J., Shu, H.B., Baichwal, V. y Goeddel, D.V. (1996b). TNF dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor 1 signalling complex. *Immunity.* **4**, 387-396.

Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.P. y Goeddel, D.V. (1996a). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor1 signal transduction pathways. *Cell* **84**, 299-308.

Hsu, H., Xiong, J. y Goeddel, D.V. (1995). The TNF receptor 1 associated protein TRADD signals cell death and NFkappa B activation. *Cell* **81**, 495-504.

Huang, P.L., Dawson, T. M., Brecht, D. S., Snyder, S. H. y Fishman, M. C. (1993). Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gen. *Cell* **75**, 1273-1286.

Hughes, G., Murphy, M.P. y Ledgerwood, E.C. (2005). Mitochondrial reactive oxygen species regulate the temporal activation of nuclear factor kappa B to modulate tumour necrosis factor induced apoptosis: evidence from mitochondria targeted antioxidants. *Biochem. J.* **389**, 83-89.

Hughes, T.K., Smith, E.M., Barnett, J.A., Charles, R. y Stefano, G.B. (1991a). LPS stimulated invertebrate hemocytes: a role for immunoreactive TNf and IL-1. *Dev. Comp. Immunol.* **15**, 117-122.

Hughes, T.K., Smith, E.M., Barnett, J.A., Charles, R. y Stefano, G.B. (1991b). Lipopolysaccharide and opioids activate distinct populations of *Mytilus edulis* immunocytes. *Cell Tissue Res.* **264**, 317-320.

Hughes, T.K., Smith, E.M., Leung, M.K. y Stefano, G.B. (1992). Immunoreactive cytokines in *Mytilus edulis* nervous and immune interactions. *Acta Biol. Hung.* **43**, 269-273.

Hunter, T. (1991). Protein kinase classification. *Methods enzymol.* **200**, 3-37.

Hunter, T. (2000). Signaling – 2000 and beyond. *Cell* **100**, 113-127.

Hunter, T. y Sefton, B.M. (1991). Protein phosphorylation (Part A: protein kinases: Assays, Purification, Antibodies, Functional analysis, Cloning and Expression). *Methods enzymol.*, Academic Press, Inc. San Diego, California.

Hurshman, A.R. y Marletta, M.A. (1995). Nitric oxide complexes of inducible nitric oxide synthase: spectral characterization and effect on catalytic activity. *Biochemistry* **34**, 5627-5634.

Ibarguren, I., Díaz-Enrich, M.J., Cao, J., Fernández, M., Barcia, R., Villamarín, J.A. y Ramos-Martínez, J.I. (2000). Regulation of the futile cycle of fructose phosphate in sea mussel. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **126**, 495-501.

Ibarguren, I., Vázquez-Illanes, M.D. y Ramos-Martínez, J.I. (1990). Seasonal variations in glycolysis in *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **97B**, 279-283.

Ignarro, L.J. (1989). Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ. Res.* **65**, 1-21.

Inagaki, N., Ito, M., Nakan, T. e Inagaki, M. (1994). Spatiotemporal distribution of protein kinase and phosphatase activities. *TIBS* **19**, 448-452.

Itoh, N., Tsujimoto, Y. y Nagata, S. (1993). Effect of *bcl-2* on Fas antigen mediate cell death. *J. Immunol.* **151**, 621-627.

Iyengar, R. (1993). Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J.* **7**, 768-777.

Jacobson, M.D., Burne, J.F. y Raff, M.C. (1994). Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J.* **13**, 1899-1910.

Janes, P. W., Ley, S. C., Magee, A. I. y Kabouridis, P. S. (2000). The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin. Immunol.* **12**, 23-24.

Johnson, L. y Barford, D. (1993). The effects of phosphorylation the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 199-232.

Jones, T.W. (1846). The blood corpuscles considered in its different phases of development in the animal series. Memoir II. Invertebrata. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **136**, 89-106.

Jorens, P.G., VanOvervel, F.J., Bult, H., Verniere, P.A. y Herman, A.G. (1991). L-arginine dependent production of nitrogen oxides by rat pulmonary macrophages. *Eur. J. Pharmacol.* **200**, 205-209.

Kanashiro, C. y Khalil, R. (1998). Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **25**, 974-985.

Karin, M. (1999). The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 7339-42.

Kauser, K. y Rubanyi, G.M. (1997). Potential cellular signaling mechanisms mediating upregulation of endothelial nitric oxide production by estrogen. *J. Vasc. Res.* **34**, 229-236.

Kazanietz, M.G. (2000). Protein kinase C and novel receptors for the phorbol esters and the second messenger diacylglycerol. *Medicina* **60**, 685-688.

Kazanietz, M.G. (2002). Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Mol Pharmacol.* **61**, 759-767.

Kazanietz, M.G., Caloca, M.J., Aizman, O. y Nowicki, S. (2001). Phosphorylation of the catalytic subunit of rat renal Na⁺, K⁺ATPase by classical PKC isoforms. *Arch. Biochem. Biophys.* **388**, 74-80.

Kelliher, M.A., Grimm, S., Ishida, Y., Kuo, F., Stanger, B.Z. y Leder, P. (1998). The death domain kinase RIP mediates the TNF induced NF κB signal. *Immunity.* **8**, 297-303.

Kennedy, B.K., Austriaco, N.R., Zhang, J.S. y Guarente, L. (1995). Mutation in the silencing gene SIR4 can delay aging in *S. cerevisiae*. *Cell* **80**, 485-496.

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. y Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257.

Khadaroo, R.G., Kapues, A., Powers, K.A., Cybulsky, M.I., Marshall, J.C. y Rotstein, O.D. (2003). Oxidative stress reprograms lipopolysaccharide signalling via Src kinase dependent pathway in RAW 264.7 macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* **278**, 47834-47841.

Khan, W., Blobe, G. y Hannun, Y. (1995). Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. *Cell. Signal.* **7**, 171, 184.

Klatt, P., Schmid, M., Leopold, E., Schmidt, K., Werner, E. R. y Mayer, B. (1994). The pteridine binding site of brain nitric oxide synthase. Tetrahydrobiopterin binding kinetics, specificity and allosteric interaction with the substrate domain. *J. Biol. Chem.* **269**, 13861-13866.

Kletsas, D., Sessa, D., Franchini, A. y Ottaviani, E. (1998). PDGF and TGF- β induce cell shape changes in invertebrates immunocytes via specific cell surface receptors. *Eur. J. Cell Biol.* **75**, 362-366.

Klevit, R. (1991). Recognition for DNA by Cys2, His2 zinc fingers. *Science* **253**, 1367-1393.

Knudsen, G.M., Nishida, C.R., Money, S.D. y Ortiz deMontellano, P.R. (2003). Nitric oxide synthase (NOS) reductase domain models suggest a new control element in endothelial NOS that attenuates calmodulin dependent activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 31814-31824.

Koehn, R.K. (1991). The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus*. *Aquaculture*, **94**, 125-145.

Kolios, G., Valatas, V. y Ward, S. G. (2004). Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immol.* **113**, 427-437.

Kollmann, M. (1980). Recherches sur les leucocytes et le tissu lymphoide des invertebrés. *Ann. Sci. Nat.* **8**, 1-240.

Konturek, S.K. y Konturek, P.C. (1995). Role of nitric oxide in digestive system. *Digestion* **56**, 1-13.

Kopec, K.K. y Carrol, R.T. (2000). Phagocytosis is regulated by nitric oxide in murine microglia. *Nitric Oxide* **4**, 103-111.

Kopp, E. y Ghosh, S. (1995). NF- κ B and rel proteins in innate immunity. *Adv. Immunol.* **58**, 1-27.

Kraft, A.S., y Anderson, W.B. (1983). Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid dependent protein kinase associated with plasma membrane. *Nature* **301**, 621-623.

Krebs, E.G. (1986). *The enzymology of control by phosphorylation*. In: The Enzymes, 3^a Ed., Academic Press, Inc., Orlando, Florida.

Kubes, P. (1992). Nitric oxide modulates epithelial permeability in the feline small intestine. *Am. J. Physiol.* **262**, 1138-1142.

Ku, W.C., Cheng, A.J. y Wang, T.C. (1997). Inhibition of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 730-736.

Kunz, D., Muhl, H., Walker, G. y Pfeilschifter, J. (1994). Two distinct signaling pathways trigger the of inducible nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5387-5391.

Kwak, J., Han, M.K., Choi, K.S., Park, I.H., Park, S.Y., Sohn, M.H., Kim, U.H., McGregor, J.R., Samlowski, W.E. y Yim, C.Y. (2000). Cytokines secreted by lymphokine-activated killer cells induce endogenous nitric oxide synthesis and apoptosis in DLD-1 colon cancer cells. *Cell. Immunol.* **203**, 84-94.

Kwon, N.S., Nathan, C. y Stuehr, D.J. (1998). Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J. Biol. Chem.* **264**, 20496-20501

Kwon, S. y George, S. (1999). Synergistic cytokine induced nitric oxide production in human alveolar epithelial cells. *Nitric Oxide* **4**, 348-357.

Kwon, O.D., Yim, C-Y., Jeong, K.S., Park, S.C., Jung, K.Y., McGregor, J.R., Bastian, N.R. y Samlowski, W.E. (2004). Suppression of cytokine-inducible nitric oxide synthesis during intraperitoneal Meth A tumor growth. *J Vet Med Sci.* **66**, 357-365.

Lacoste, A., Malham, S.K., Cueff, A. y Poulet, S.A. (2001). Stress induced catecholamine changes in the hemolymph of the oyster *Cassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* **26**, 1-9.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lamas, S., Marsden. P.A., Li, G. K., Tempst, P. y Michel, T. (1992). Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6348-6352.

Lanz, H., Tsutsumi, V. y Arechiga, A. (1993). Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarki* blood cells. *Dev. Comp. Immunol.* **17**, 389-397.

Lee, S.Y., Reichlin, A., Santana, A., Sokol, K.A., Nussenzweig, M.C. y Choi, Y. (1997). TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity* **7**, 703-713.

Le Good, J., Ziegler, W., Parekh, D., Alessi, D., Choen, P. y Parker, P. (1998). Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**, 2042-2045.

Leibersperguer, H., Gschwendt, M., Gernol, M. y Mark, F. (1991). Immunological demonstration of a calcium unresponsive protein kinase C of the S-type in different species and murine tissues. *J. Biol. Chem.* **31**, 415-430.

Leonard, W.J. y Lin, J-X. (2000). Cytokine receptor signalling pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 877-888.

Li, J., Billiar, T.R., Talanian, R.V. y Kim, Y.M. (1997). Nitric oxide reversible inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 419-424.

Lien, E., Means, T.K., Heine, H., Yoshimura, A., Kusumoto, S., Fukase, K., Fenton, M.J., Oikawa, M., Qureshi, N., Monks, B., Finberg, R.W., Ingalls, R.R. y Golenbock, D.T. (2000). Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* **105**, 497-504.

Liew, F.Y. (1994). Biology of nitric oxide in neuroimmunoregulation. *Ann. Acad. Sci.* **741**, 39-45.

Lindquist, S. y Craig, E.A. (1988). The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631-677.

Liu, J., Hughes, T.E. y Sessa, W.C. (1997). The first 35 amino acids and fatty acylation sites determine the molecular targeting of endothelial nitric oxide synthase into the Golgi region of cells: a green fluorescent protein study. *J. Cell. Biol.* **137**, 245-261.

Liu, M.K., Herrera-Velit, R., Browsey, W. y Reiner, N.E. (1994). CD14 dependent activation of protein kinase C and mitogen activated protein kinases (p42 and p44) in human monocytes treated with bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **153**, 2642-2652.

Liu, Z-G. y Han, J. (2001). Cellular responses to tumor necrosis factor (TNF). *Current. Issues. In Mol. Biol.* **3**, 79-90.

- Liu, Z-G. (2005). Molecular mechanism of TNF signalling and beyond. *Cell. Res.* **15**, 24-27.
- Lomo, J., Blomhoff, H.K., Beiske, K., Stokke, T. y Smelland, E. (1995). TGF- β 1 and cyclic AMP promote apoptosis in resting human B lymphocytes. *J. Immunol.* **154**, 1634-1643.
- Lorenz, S. De Guarrini, S., Smith, V.J. y Ferrero, E.A. (1999). Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans in vivo. *Fish Shellfish Immunol.* **9**, 31-50.
- Lorenz, S., Francese, M., Smith, V.J. y Ferrero, E.A. (2001). Heavy metal affect the circulatin haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish Shellfish Immunol.* **11**, 459-472.
- Lowenstein, C.J., Alley, E.E., Raval, P., Snowman, A.M., Snyder, S.H., Russell, S.W. y Murphy, W.J. (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene: Two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9730-9734.
- Lowesntein, C.J., Glatt, C.S., Bredt, D.S. y Snyder, S.H. (1992). Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6711-6715.
- Lu, Y. y Durkin, J.P. (1997). Protein kinase C in IL-2 signal transduction. *Immunol. Res.* **16**, 355-374.
- Lu, Y. y Durkin, J.P. (1999). Signalling events mediating the activation of protein kinase C by interleukin 2 in cytotoxic T cells. *Cell. Signal.* **11**, 275-285.

Lyons, C.R., Orloff, G.J y Cunningham, J.M. (1992). Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* **267**, 6370-6374.

Manger, P., Li, J., Christensen, B.M. y Yoshino, T.P. (1996). Biogenic monoamines in the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*: Influence of infection by the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Comp. Biochem. Physiol.* **114**, 227-234.

Marletta, M. A. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**, 12231-12234.

Marletta, M.A., Yoon, P.S., Iyengar, R., Leaf, C.D. y Wishnok, J.S. (1988). Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochem.* **27**, 8706-8711.

Marshall, A.J. y Williams, W.D. (1980). *Tipo Moluscos*. En: Zoología. Invertebrados, volumen I. Ed. Reverté. Barcelona, pp 683-823.

Massagué, J y Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF- β /Smad signalling system. *EMBO J.* **19**, 1745-1754.

Massagué, J. y Chen, Y.G. (2000). Controlling TGF- β signalling. *Genes Dev.* **14**, 627-644.

Mathews, C.K. y van Holde, K.E. (1998). *Metabolismo de los hidratos de carbono I: procesos anaerobios en la generación de energía metabólica*. En: Bioquímica, 2ª Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, pp. 526-527.

Matsubara, M., Hayashi, N., Jing, T., y Ttani, K. (2003). Regulation of endothelial nitric oxide synthase by protein kinase C. *J. Biochem.* **133**, 773-781.

Mayo, M.W. y Baldwin, A.S. (2000). The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochem. Biophys. Acta* **1470**, 1442-1445.

McCabe, J.B. y Berthiaume, L.G. (1999). Funcional roles for fatty acylated amino Terminal domains in subcellular localization. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 3771-3786.

McMillan, K. y Masters, B.S. (1995). Prokaryotic expression of the heme and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cystine-415. *Biochemistry* **34**, 3686-3693.

Meda, L., Cassatella, M.A., Szendrei, G.I., Otvos, L., Baron, P., Villalba, M., Ferrari, D. y Rossi, F. (1995). Activation of microglial by amyloid protein and interferon- γ . *Nature* **374**, 647-650.

Meinkoth, J.L., Ji, Y., Taylor, S.S. y Feramisco, J.R. (1990). Dymanics of the distribution of cyclic AMP dependent protein kinase in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9595-9599.

Meister, M., Lemaitre, B. y Hoffmann, J.A. (1997). Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *Bioessays* **19**, 1019-1026.

Melkonian, K.A., Ostermeyer, A.G., Chen, J.Z., Roth, M.G. y Brown, D.A. (1999). Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent resistan membrane rafts. Many raft protein are acylated, while few are preylated. *J. Cell. Biol.* **274**, 3910-3917.

Mercado, L.A., Cao, A., Barcia, R. y Ramos-Martínez, J.I. (2002a). Purification of a lipid activated and Ca²⁺ independent protein kinase from the mantle of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Mol. Cell. Biochem.* **233**, 99-105.

Mercado, L.A., Cao, A., Barcia, R. y Ramos-Martínez, J.I. (2002b). Regulatory properties of p105: a novel PKC isoenzyme in mantle tissue from marine mussels. *Biochem. Cell. Biol.* **80**, 771-775.

Mercado, L.A., Cao, A., Barcia, R. y Ramos-Martínez, J.I. (2003). Phorbol esters induce translocation of the nPKC p105 to membrana in mussels hemocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **250**, 41-45.

Mercurio, F., Xhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young, D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A. y Rao, A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine activated I κ B kinases essential for NF κ B activation. *Science* **278**, 860-866.

Middaugh, D.P., Chapman, P.J. y Shelton, M.E. (1996). Response of embryonic and larval inland silversides, *Menidia beryllina*, to a water soluble fraction formed during biodegradation of artificially weathered Alaska North Slope crude oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **31**, 410-419.

Middaugh, D.P., Shelton, M.E., McKenney, C.L., Cherr, G., Chapman, P.J. y Courtney, L.A. (1998). Preliminary observations on responses of embryonic and larval pacific herring, *Clupea pallasii*, to neutral fraction biodegradation products of weathered Alaska North Slope oil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **34**, 188-196.

Miller, R.T., Martásek, P., Omura, T. y Masters, B.S.S. (1999). Rapid kinetic studies of electron transfer in the three isoforms of nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 184-188.

Milligan, G., Parenti, M y Magee, A.I. (1995). The dynamic role of palmitoylation at Cys 3 causes extra-activation of the alpha subunit of the stimulatory GTP-binding protein Gs. *Eur. J. Biochem.* **257**, 236-241.

Mills, C.D. (1991). Molecular basis of suppressor macrophages Arginine metabolism via the nitric oxide synthase pathway. *J. Immunol.* **146**, 2719-2723.

Miyajima, A., Kitamura, T., Harada, N., Yokota, T. y Arai, K. (1992). Cytokine receptors and signal transduction. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 295-331.

Moncada, S. (1992). The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Act. Physiol. Scand.* **145**, 201-227.

Moncada, S. Palmer, R.M.J. y Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.

Mohamed, F., Monge, J.C., Gourdon, A., Cernacek, P., Blais, D. y Stewart, D.J. (1995). Lack of role for nitric oxide (NO) in the selective destabilization of endothelial NO synthase mRNA by tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* **15**, 52-57.

Montminy, M. (1997). Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 807-22.

Moore, N.N. y Lowe, D.H. (1977). The cytology and cytochemistry of the haemocyte of *Mytilus edulis* and their response to experimentally injected carbon particules. *J. Invertebr. Pathol.* **29**, 18-30.

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365.

Nagata, S. y Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* **267**, 1449-1456.

Nappi, A.J. y Ottaviani, E. (2000). Cytotoxic and cytotoxic molecules in invertebrates. *Bioessays* **22**, 469-480.

Nappi, A.J. y Vass, E. (1993). Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment. Cell. Res.* **6**, 117-126.

Nappi, A.J. y Vass, E. (2000). *Cytotoxic reactions associated with insect immunity: Signaling pathways and killing molecules*. En *Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune System*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 329-348.

Nathan, C. y Xie, Q-W. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**, 13725-13728.

Nigg, E.A., Hilz, H., Eppenberger, H.M. y Dutly, F. (1985). Rapid and reversible translocation of the catalytic subunit of cAMP dependent protein kinase type II from the Golgi complex to the nucleus. *EMBO J.* **4**, 2801-2806.

Nishimura, J.S., Martásek, P., McMillan, K., Salerno, J.C., Liu, Q., Gross, S.S. y Masters, B.S.S. (1995). Modular structure of neuronal nitric oxide synthase: localization of the arginina binding site and modulation by pterin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **210**, 288-294.

Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**, 484-496.

Nöel, S., Bacherère, E. y Mialhe, E. (1993). Phagocytosis associated chemiluminiscence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Dev. Comp. Immunol.* **17**, 483-493.

Nöel, D., Pipe, R.K., Elston, R. y Barchér, E. (1994). Antigenic characterization of haemocyte sub-populations in the mussel *Mytilus edulis* by means of monoclonal antibodies. *Mar. Biol.* **119**, 549-556.

Oberhammer, F.A., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R. y Sikorska, M. (1993). Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J.* **12**, 3679-3684.

Oberhammer, F.A., Pavelka, M., Sharma, S., Tiefenbacher, R. Purchio, A.F., Bursch, W., y Schulte-Hermann, R. (1992). Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5408-5412.

Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1989). Phorbol ester binding to protein kinase C requires cysteine rich zinc finger like sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4868-4871.

Osada, M. y Nomura, T. (1989). Seasonal variations of catecholamine levels in the tissues of the japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol.* **93**, 171-173.

Osada, S., Mizuno, K., Saido, T., Suzuki, K., Kuroki, T. y Ohno, S. (1992). A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3930-3938.

Ottaviani, E., Caselgrandi, E. y Kletsas, D. (1998). The CRH-ACTH biogenic amine axis in invertebrate immunocytes activated by PDGF and TGF- β . *FEBS Lett.* **427**, 255-258.

Ottaviani, E., Franchini, A., Cassanelli, S., Cosarizza, A. y Franceschi, C. (1994). Relationship between corticotropin releasing factor and interleukin-2: Evolutionary evidence. *FEBS Lett.* **351**, 19-21.

Ottaviani, E., Franchini, A., Cassanelli, S. y Genedani, S. (1995). Cytokines and invertebrate immune responses. *Biol. Cell* **85**, 87-91.

Ottaviani, E., Franchini, A. y Franceschi, C. (1993a). Presence of several cytokine-like molecules in mollusc haemocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 984-988.

Ottaviani, E., Franchini, A. y Franceschi, C. (1997). Pro-opiomelanocortin derived peptides, cytokines and nitric oxide in immune responses and stress: an evolutionary approach. *Int.Rev. Cytol.* **170**, 79-141.

Ottaviani, E., Franchini, A. y Kletsas, D. (2001). Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta in invertebrate immune and neuroendocrine interactions: another sign of conservation in evolution. *Comp. Biochem. Physiol.* **129**, 295-306.

Ottaviani, E., Malagoli, D. y Franchini, A. (2004). Invertebrate humoral factors: cytokines as mediators of cell survival. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **34**, 1-25.

Ottaviani, E., Paemen, L.R. y Stefano, G.B. (1993b). Evidence for nitric oxide production and utilization as a bactericidal agent by invertebrate immunocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **248**, 319-324.

Owen, G. (1966). *Digestion*. En: Physiology of Mollusca, volumen 2. Ed. K.M. Wilbur y C.M. Yonge. Academic Press. Mew York, pp 53-59.

Ozaki, M., Kawashima, S., Yamashita, T., Hirase, T., Namiki, M., Inoue, N., Hirata, K., Yasui, H., Sakurai, H., Yoshida, Y., Masada, M. y Yokohama, M. (2002). Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE deficient mice. *J. Clin. Invest.* **110**, 331-340.

Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, L.M. y Donner, D.B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**, 82-85.

Palmer, R.M.K., Ashton, D.S. y Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**, 664-666.

- Panda, K., Rosenfeld, R.J., Ghosh, S., Meade, A.L., Getzoff, E.D., y Stuehr, D.J. (2002). Distinct dimmer interaction and regulation in niteic oxide synthase types I, II, and III. *J. Biol. Chem.* **277**, 31020-31030.
- Pani, A.K. y Croll, R.P. (2000). Catecholamine concentrations in the hemolymph of the scallop, *Placopecten magellanicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **118**, 48-56.
- Papapetropoulos, A., García-Cardena, G., Madri, J.A. y Sessa, W.C. (1997). Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* **100**, 3131-3139.
- Pearce, A. y Humphrey, T.C. (2001). Integrating stress response and cell cycle checkpoint pathways. *Trends. Cell. Biol.* **11**, 426-433.
- Peng, H.B., Libby, P. y Liao, J.K. (1995). Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J. Biol. Chem.* **270**, 14214-14219.
- Pfeilschifter, K., Eberhardt, W., Hummel, R., Kunz, D., Muhl, K., Nitsch, D., Pluss, C. y Walker, G. (1996). Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase potential for a novel class of anti-inflammatory agents. *Cell. Biol. Int.* **20**, 51-58.
- Pham, T.N.Q., Brown, B.L., Dobson, P.R.M y Richardson, V.J. (2003). Protein kinase C-eta (PKC- η) is required for the development of inducible nitric oxide synthetase (iNOS) positive phenotype in human monocytic cells. *Nitric Oxide* **9**, 123-134.
- Pipe, R.K. (1990a). Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.* **22**, 595-603.
- Pipe, R. K. (1990b). Hidrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem. J.* **22**, 595-603.

Pipe, R.K. (1992). Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* **16**, 111-122.

Pipe, R.K., Farley, R.S. y Coles, A.J. (1997). The separation characterization of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. *Cell. Tissue. Res.* **289**, 537-545.

Pipe, R.K., Holden, J.A. y Farley, S.R. (1994). The separation and characterization of haemocytes from the marine mussels *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* **1851**, 5113-5115.

Pollock, J.S., Klinghofer, V., Forstermann, V. y Murad, F. (1992). Endothelial nitric oxide synthase is myristylated. *FEBS Lett.* **309**, 402-404.

Porter, T.D. y Coon, M.J. (1991). Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* **266**, 13469-13472.

Power, A., Mukanhy, F.M. y Sheehan, D. (1998). Molluscan cell culture. *Comp. Biochem. Physiol.* **4**, 165.

Prabhakar, P., Thatte, H.S., Goetz, R.M., Cho, M.R., Golan, D.E. y Michel, T. (1998). Receptor regulated translocation of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **273**, 27383-27388.

Quest, A., Bloomenthal, J., Bardes, E.S. y Bell, R.M. (1992). The regulatory domain of protein kinase C coordinates four atoms of zinc. *J. Biol. Chem.* **267**, 10193-10197.

Raff, M.C., Barres, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y. y Jacobson, M.D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival. *Science* **262**, 695-700.

Raman, C.S., Li, H., Martasek, P., Oral, V., Masters, B.S. y Poulos, T.L. (1998). Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* **23**, 939-950.

Rasmussen, L.P.D., Hage, E. y Karlog, O. (1985). An electron microscope study of the circulating leucocytes of the marine mussels *Mytilus edulis*. *J. Invertebr. Pathol.* **45**, 158-167.

Ratcliffe, N.A. y Rowley, A.F. (1979). A comparative synopsis of the structure and function of the blood cells of insects and other invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* **3**, 189-221.

Ratcliffe, N.A. y Rowley, A.F. (1981). Invertebrate blood cells, vol I y vol II. Academic Press, New York.

Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W. y Rhodes, C.P. (1985). Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.* **97**, 183-350.

Renè, R. y Spitzer, J.A. (1997). Effects of female hormones (17 β -Estradiol and progesterone) on nitric oxide production by alveolar macrophages in rats. *Nitric Oxide* **1**, 453-462.

Resh, M.D. (1999). Fatty acylation of proteins, new insights intomembrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochem. Biophys. Acta* **1451**, 1-16.

Richards, M.K. y Marletta, M.A. (1994). Characterization of neuronal nitric oxide synthase and a C415H mutant purified from a baculovirus overwxpression systems. *Biochemistry* **33**, 14723-14732.

Robbins, R.A., Barnes, P.J., Springall, D.R., Warren, J.B., Kwon, O.J., Buttery, L.D. K., Wilson, A.J., Geller, D.A. y Polar, J.M. (1994). Expression of inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**, 209-218.

Robinson, L.J. y Michel, T. (1995). Mutagenesis of palmitoylation sites in endothelial nitric oxide identifies a novel motif for dual acylation and subcellular targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11776-11780.

Robinson, L.J., Busconi, L. y Michel, T. (1995). Agonist modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **270**, 995-998.

Robledo, J.A.F., Santarém, M.M., González, P. y Figueras, A. (1995) Seasonal variations in the biochemical composition of the serum of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its relationship to the reproductive cycle and parasitic load. *Aquaculture* **133**, 311-322.

Romashkova, J.A. y Makarov, S.S. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* **401**, 86-90.

Ron, D. y Kazanietz, M. (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* **13**, 1658-1676.

Rothe, J., Gehr, G., Loetscher, H. y Lesslauer, W. (1992). Tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Immunol. Res.* **11**, 81-90.

Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J. y Goeddel, D.V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78**, 681-692.

Saavedra, J.E., Billiar, T.R., Williams, D.L., Kim, Y.M., Watkins, S.C. y Keefer, L.K. (1997). Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. Design of a liver selective NO donor prodrug that block tumor necrosis factor alpha induced apoptosis and toxicity in the liver. *J. Med. Chem.* **40**, 1947-1954.

Sabatier, A. (1877). Etudes sur la moule commune (*Mytilus edulis*), Première partie. *Men. Ac. Sc. Lett. Montpellier* **8**, 129.

Sakoda, T., Hirata, K., Kuroda, R., Miki, N., Suematsu, M., Kawashima, S. y Yokoyama, M. (1995). Myristoylation of endothelial cell nitric oxide synthase is important for extracellular release of nitric oxide. *Mol. Cell. Biochem.* **152**, 143-148.

Sánchez-Capelo, A. (2005). Dual role for TGF- β_1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 15-34.

Sanjuan, A., Quesada, H., Zapata, C. y Alvarez, G. (1987). Identificación del mejillón del N.O. de la península ibérica como *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Act Cient. Compost.*

Sano, M., Yamazaki, Y. y Mizutani, A. (1983). Detergent extraction of a regulatory subunit of brain adenylate cyclase and its sensitivity to calmodulin and forskolin. *Biochem. Int.* **7**, 463-469.

Santarém, M.M., Robledo, J.A.F. y Figueras, A. (1994). Seasonal changes in hemocytes and serum defense factors in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dis. Aquat. Org.* **18**, 217-222.

Santarém, M.M., Robledo, J.A. F., Figueras, A. y Caldas, J.R. (1992). Variation of the defence mechanisms in two groups of mussels, *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Seasonal and enviromental effects-preliminary results. *Aquaculture* **107**, 185-188.

Santhanagopalan, V. y Yoshino, T.P. (2000). Monoamines and their metabolitos in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol.* **125**, 469-478.

Scott, J.D. (1991). Cyclic nucleotide depedent protein kinases. *Pharmacol. Ther.* **50**, 123-145.

Schlapbach, R., Spanaus, K-S., Malipiero, U., Lens, S., Tasinato, A., Tschopp, J. y Fontana, A. (2000). TGF- β induces the expression of the FLICE inhibitory protein andinhibits Fas mediated apoptosis of microglia. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3680-3688.

Schaap, D., Parker, P., Bristol, A., Kriz, R. y Knopf, J. (1989). Unique substrate specificity and regulatory properties of PKC- ϵ a rationale for diversity. *FEBS Lett.* **243**, 351-347.

Schmidt, H.H.H., Warner, T.D., Nakane, M, Forstermann, U. y Murad, F. (1992). Regulation and subcellular location of nitrogen oxide synthases in RAW264.7 macrophages. *Mol. Pharmacol.* **41**, 615-624.

Schulz, K., Kerber, S. y Kelm, M. (1999). Reevaluation of the Griess method for determing NO/NO₂- in aqueous and protein-containing samples. *Nitric Oxide* **3**, 225-234.

Searles, C.D., Miwa, Y., Harrison, D.G. y Ramasamy, S. (1999). Posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase during cell growth. *Circ. Res.* **85**, 588-595.

Sessa, W.C., Barber, C.M. Y Lynch, K.R. (1993). Mutation of N-myristoylation site converts endothelial cell nitric oxide synthase from a membrane to a cytosolic protein. *Circ. Res.* **72**, 921-924.

Sharkey, N., Leach, K. y Blumberg, P. (1984). Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 607-610.

Shelton, M.E., Chapman, P.J., Foss, S.S. y Fisher, W.S. (1999). Degradation of weathered oil by mixed marine bacteria and the toxicity of accumulated water soluble material to two marine crustacean. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **36**, 13-20.

Sheta, E.A., McMillan, K., Masters, B.S.S. (1994). Evidence of a bidomain structure of constitutive cerebellar nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **269**, 15147-15153.

Shima, Y., Nakao, K., Nakashima, T., Kawakami, A., Nakata, K., Hamasaki, K., Kato, Y., Eguchi, K. y Ishii, N. (1999). Activation of caspase 8 in transforminig groeth factor beta induced apopotosis of human hepatoma cells. *Hepatol.* **30**, 1215-1222.

Simoncini, T., Hafezi-Moghadam, A., Brazil, D. P., Ley, K., Chin, W. W. y Liao, J. K. (2000). Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* **407**, 538-541.

Simons, K.y Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**, 31-39.

Sloley, B.D., Juorio, A.V. y Durden, D.A. (1990). High performance liquid chromatographic análisis of manoamines and some of their γ -glutamil conjugates produced by the brain and other tissues of *Helix aspersa* (Gastropoda). *Cell. Mol. Neurobiol.* **10**, 175-191.

Smith, C.A., Farrah, T. y Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell* **76**, 59-62.

Smith, C.A., Williams, G.T., Kingston, R., Jenkinson, E.J. y Owen, J.J.T. (1989). Antibodies to CD3/Tcell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature* **337**, 181-184.

Smith, V.J. (1991). Invertebrate Immunology: Phylogenetic, Ecotoxicological and Biomedical. *Comp. Haematol. Int.* **1**, 61-76.

Smith, V.J. y Söderhäll, K. (1983). Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish *Astacus astacus* by componentes of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell Tissue Res.* **233**, 295-303.

Smith, V.J. y Söderhäll, K. (1991). A comparasion of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* **15**, 251-261.

Snyder, M.J., Girvetz, W. y Mulder, E.P. (2001). Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **41**, 22-29.

Soares da Silva, I.M., Vilanova, M., Bleher, R. y Machado, J. (2002). Cytometric, morphologic and enzymatic characterisation of haemocytes in *Anadonta cygnea*. *Comp. Biochem. Physiol.* **132A**, 541-553.

Söderhäll, K. y Smith, V.J. (1983). Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods and prophenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* **7**, 229-239.

Solomon, E.P., Berg, L.R. y Martin, D.W. (2001). *Ecología y Biosfera*. En: Biología, 5ª Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, pp 1176-1178.

Song, Y., Zweier, J.L. y Xia, Y. (2001). Heat-shock protein 90 augments neuronal nitric oxide synthase activity by enhancing Ca²⁺/calmodulin binding. *Biochem. J.* **355**, 357-360.

Sowa, G., Liu, J., Papapetrououlos, A., Rex-Haffener, M., Hughes, T.E. y Sessa, W.C. (1999). Trafficking of endothelial nitric oxide synthase in living cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 22524-22531.

Sowa, H., Kaji, H., Iu, M.F., Tsukamoto, T., Sugimoto, T. y Chihara, K. (2003). Parathyroid hormona Smad3 axis exerts anti-apoptotic action and augments anabolic action of transforming growth factor beta in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* **278**, 5240-5252.

Spies, R.B. y Davis, P.H. (1982). Toxicity of Santa Barbara Seoop oil to starfish embryos. Part 3. Influence of parental exposure and the effects of other curde oils. *Mar. Environ. Res.* **6**, 3-12.

Stamler, J.S., Lamas, S. y Fang, F.C. (2001). Nitrosylation: The prototypic redox based signaling mechanism. *Cell* **106**, 675-683.

St-Denis, A., Chano, F., Tremblay, P. St-Pierre, Y. y Descoteaux, A. (1998). Protein kinase Ca modulates lipopolysaccharide induced functions in a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* **273**, 32787-32792.

Stefano, G.B., Smith, E.M. y Hughes, T.K. (1991). Opioid induction of immunoreactive interleukin-1 in *Mytilus edulis* and human immunocytes; an interluekin-1 like substances in invertebrate neural tissue. *J. Neuroimmunol.* **32**, 29-34.

Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdiument-Bromage, H., Painter, G.F., Holesmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., Hawkins, P.T. (1998). Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* **279**, 710-714.

Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Painter, G.F., Holmes, A.B., McCormick, F. y Hawkins, P.T. (1997). Dual role of phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* **277**, 567-570.

Stout, R.D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S.K. y Suttles, J. (2005). Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvirommental influences. *J. Immunol.* **175**, 342-349.

Strasser, A., Puthalakath, H., Bouillet, P., Huang, D.C., O'Connor, L., O'Reilly, L.A., Cullen, L., Cory, S., Adams, J.M. (2000). The role of bim, a proapoptotic BH3 only member of the Bcl-2 family in cell death control. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **917**, 541-548.

Stuehr, D.J. (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 339-359.

Stuehr, D.J., Cho, H.J., Kwon, N.S., Weise, M.F. y Nathan, C. (1991b). Purification and characterization of the cytokine induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD and FMN containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7773-7777.

Stuehr, D.J., Kwon, N.S., Nathan, C. F., Griffith, O. W., Feldman, P.L. y Wiseman, L. (1991a). N-omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J. Biol. Chem.* **266**, 6259-6263.

Stull, J.T. (2001). Ca²⁺ dependent cell signalling through calmodulin activated protein phosphates and protein kinases minireview series. *J. Biol. Chem.* **276**, 2311-2312.

Sweet, M.J. y Hume, D.A. (1996). Endotoxin signal transduction in macrophages. *J. Leukocyte Biol.* **60**, 8-13.

Tai, X.G., Toyo-oka, K., Yamamoto, N., Yashiro, Y., Mu, J., Hamaoka, T. y Fujiwara, H. (1997). Expression of an inducible type of nitric oxide (NO) in deletion of TCR stimulated double positive thymocytes. *J. Immunol.* **158**, 4696-4703.

Tak, P.P. y Firestein, G.S. (2001). NFκB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* **107**, 7-11.

Takahashi, A. y Earnshaw, W. C. (1996). In vitro systems for the study of apoptosis. *Adv. Pharmacol.* **41**, 89-106.

Takahashi, S. y Mendelsohn, M.E. (2003). Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J. Biol. Chem.* **278**, 30821-30827.

Tartaglia, L.A., Goeddel, D.V., Reynolds, C., Figari, I.S., Weber, R.F., Fendly, B.M. y Palladino, M.A.Jr. (1993). Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J. Immunol.* **151**, 4637-4641.

Tayeh, M.A. y Marletta, M.A. (1989) Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J. Biol. Chem.* **264**, 19654-19658.

Taylor, S.S., Buechler, J.A. y Yonemoto, W. (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 971-1005.

Tegge, W., Frank, R., Hofmann, F. y Dostmann, W.R.G. (1995). Determination of cyclic nucleotide dependent protein kinase substrate specificity by the use of peptide libraries on cellulose paper. *Biochemistry* **34**, 10569-10577.

Tepperman, B.L., Chang, Q. y Soper, B.D. (2000). Protein kinase C mediates lipopolysaccharide and phorbol induced nitric oxide synthase activity and cellular injury in the rat colon. *Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 1249-1257.

Thompson, C.B. (1995). New insights into recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity* **3**, 531-539.

Torreilles, J. y Guérin, M.C. (2001). The contribution of invertebrate study to the biology of nitric oxide. *J. Soc. Bio.* **195**, 413-417.

Tracey, K.J. y Cerami, A. (1993). Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **9**, 317-343.

Tzeng, E., Billiar, T.R., Robbins, P.D., Loftus, M. y Stuehr, D. (1995). Expression of human inducible nitric oxide synthase in a tetrahydrobiopterin (H₄B) deficiente cell line: H₄B promotes assembly of enzyme subunits into an active dimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 11771-11775.

Ulevitch, R.J. y Tobias, P.S. (1995). Receptor-dependent mechanisms of cell Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 437-457.

Van Antwerp, D. J., Martín, S.J., Kafri, T., Green, D.R. y Verma, I.M. (1996). Supresión of TNF- α induced apoptosis by NF κ B. *Science* **274**, 787-789.

Vaux, D.L. y Strasser, A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2239-2244.

Verma, I.M., Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D. y Miyamoto, S. (1995). Rel/ NF- κ B/ I κ B family: intimate toles of association and dissociation. *Genes Dev.* **9**, 2723-2735.

von Knethen, A., Tautenhahn, A., Link, H., Lindemann, D. y Brune, B. (2005). Activation induced depletion of protein kinase C alpha provokes desensitization of monocytes/macrophages in sepsis. *J. Immunol.* **174**, 4960-4965.

Voronezhskaya, E.E., Hiripi, L., Elekes, K. y Croll, R.P. (1999). Development of catecholaminergic neurons in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*: I. Embryonic development of dopamine containing neurons and dopamine dependent behaviours. *J. Comp. Neurol.* **404**, 285-296.

Wald, D., Commane, M., Stark, G.R. y Li, X. (2001). IRAK and TAK1 are required for IL-18 mediated signaling. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3747-3754.

Wallach, D., Kovalenko, A.V., Varfolomeev, E.E. y Boldin, M.P. (1998). Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 279-288.

Wang, A., Stuehr, D. J. y Rousseau, D. (1995). Tetrahydrobiopterin deficient nitric oxide synthase has a modified heme environment and forms a cytochrome P-420 analogue. *Biochemistry* **34**, 7080-7087.

Wang, C-Y., Mayo, M.W. y Baldwin, A.S. (1996). TNF- α and cancer therapy induced apoptosis potentiation by inhibition of NF κ B. *Science* **274**, 784-787.

Wang, J., Roseau, D.L., Abu-Soud, H. y Stuehr, D.J. (1994). Heme coordination of NO in NO synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10512-10516.

Waring, M.J. (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol.* **13**, 269-282.

Weinstein, S.L., Gold, M.R. y DeFranco, A. L. (1991). Bacterial lipopolysaccharide stimulates protein tyrosine phosphorylation in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4148-4152.

Weiss, G., Werner-Felmayer, G., Werner, E.R., Grunewald, K., Watcher, H. y Hentze, M.W. (1994). Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription. *J. Exp. Med.* **180**, 969-976.

Weiss, M., Fischer, G., Barth, E., Boneberg, E., Schneider, E.M., Georgieff, M. y Hartung, T. (2001). Dissociation of LPS induced monocytic ex vivo production of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) and TNf- α in patients with septic shock. *Cytokine* **13**, 51-54.

Wells, A.V., Li, P., Champion, P.M., Martinis, S.A. y Sligar, S.G. (1992). Resonance Raman investigations of *Escherichia coli* expressed *Pseudomonas putida* cytochrome P450 and P420. *Biochemistry* **18**, 4384-4393.

White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrel, K. y Steller, H. (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* **264**, 677-683.

Wieprecht, M., Wieder, T. y Geilen, C.C. (1994). N-[2-Bromocinnamyl (amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89) inhibits incorporation of choline into phosphatidylcholine via inhibition of choline kinase and has no effect on the phosphorylation of CTP: phosphocholine cytidyltransferase. *Biochem. J.* **297**, 241-247.

Williams, G.T. (1991). Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell* **65**, 1097-1098.

Williams, G.T. y Smith, C.A. (1993). Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell* **74**, 777-779.

Williams, T. (1852). On the blood proper and chylaqueous fluid of invertebrate animals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **142**, 595-653.

Wink, D.A. y Mitchell, J.B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, citotoxic and citoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 434-456.

Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. y Mathison, J.C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431-1433.

Wu, C-H., Chang, C.H., Lin, H.C., Chen, C.M., Lin, C.H. y Lee, H.M. (2003). Role of protein kinase C in BSA-AGE mediated inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Pharm.* **66**, 203-212.

Xiao, R., Becker, K., Stribling, S., Peters, K. y Hannun, Y. (2000). Regulation of receptor mediated protein kinase C membrane trafficking by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **275**, 17024-17034.

Xie, Q-W., Leung, M., Fuortes, M., Sassa, S. y Nathan, C. (1996). Complementation analysis of mutants of nitric oxide synthase reveals that the active site requires two hemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4891-4896.

Xie, Q-W., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Seiderek, K. M, Lee, T. D., Ding, A., Troso, T. y Nathan, C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**, 225-228.

Xie, Q-W., Kashiwabara, Y. y Nathan, C. (1994). Role of transcription factor NF κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **269**, 4705-4708.

Xie, Q-W., Whisnant, R. y Nathan, C. (1993). Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **177**, 1779-1784.

Yamanishi, J., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Castagna, M. y Nishizuka, Y. (1983). Synergistic function of phorbol ester and calcium in serotonin release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112**, 778-

Yamate, J., Maeda, M., Benn, S.J., Laithwaite, J.E., Allan, A., Ide, M., Kuwamura, M., Kotani, T., Sakuma, S. y LaMarre, J. (2001). Effects of lipopolysaccharide on a macrophage like cell line (HS-P) from a rat histiocytic sarcoma. *J. Comp. Path.* **125**, 15-24.

Yeh, D. C., Duncan, J. A., Yamashita, S. y Michel, T. (1999). Depalmitoylation of endothelial nitric oxide synthase by acyl-protein thioesterase 1 is potentiated by Ca (2+) calmodulin. *J. Biol. Chem.* **274**, 33148-33154.

Yeung, O. y Hurta, R. A. (2001). Phorbol ester tumour promoter mediated altered expresión and regulation of matrix metalloproteinase-2 in a H-ras transformed cell line capable of benign tumour formation. *Mol. Cell. Biochem.* **220**, 39-48.

Yousefi, S., Green, D.R., Blaser, K. y Simon, H.U. (1994). Protein tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophil and neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10868-10872.

Zandee, D. I., Klytmans, J. H., Zurburg, W. y Pieters, H. (1980). Seasonal variations in biochemical composition of *Mytilus edulis* with references to energy metabolism and gametogenesis. *Neth. J. Sea. Res.* **14**, 1-29.

Zeiber, A. M., Fissithaler, B., Schray-Utz, B. y Busse, R. (1995). Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultures human endothelial cells. *Circ. Res.* **76**, 980-986.

Zhang, G., Kazanietz, M., Blumberg, P. y Hurley, J. (1995). Crystal structure of the Xys 2 activator binding domain of protein kinase C δ in complex with phorbol ester. *Cell* **81**, 917-924.

Zhang, J., Patel, J.M., Li, Y.D. y Block, E.R. (1997). Proinflammatory cytokines downregulate gene expression and activity of constitutive nitric oxide synthase in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **96**, 71-87.

Zhang, J., Tachado, S.D., Patel, N., Zhu, J., Imrich, A., Manfrueilli, P., Cushion, M., Kinnane, T.B. y Koziel, H. (2005). Negative regulatory role of mannose receptors on human alveolar macrophage proinflammatory cytokine release in vitro. *J. Leukoc. Biol.* **6** (en prensa).

Zhang, W., Kuncewicz, L.Yu, Z.Y., Zou, L., Xu, X. y Kone, B.C. (2003) Protein- protein interactions involving inducible nitric oxide synthase. *Acta Physiol. Scand.* **179**, 137-142.

Zhao, B., Stavchansky, S.A., Bowden, R.A. y Bowman, P.D. (2003). Effect of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha on gene expression in human endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**, 1577-1583.

Ziemiecki, A., Harper, A.G. y Wilks, A.F. (1994). JAK protein tyrosine kinases: their role in cytokine signalling. *Trends. Cell Biol.* **4**, 207-213.

Zinyama, R.B., Bancroft, G.J. y Sigola, L.B. (2001). Adrenaline suppression of the macrophage nitric oxide response to lipopolysaccharide is associated with differential regulation of tumour necrosis factor α and interleukin 10. *Immunol.* **104**, 439-446.

ACTH	hormona adrenocórticotropa
ACTH 1-24	fragmentos de ACTH comprendido entre los aminoácidos 1-24
ADN	ácido desoxirribunucleico
ALS S	solución antiagregante de Alseve suplementada
ALS	solución antiagregante de Alseve
AMP_C	adenosina - 3', 5'- monofosfato - cíclico
aPKC	proteína quinasa C atípica
ARNm	ácido ribunucleico mensajero
ARNsa	ribonucleasa
ATP	adenosina – 5'- trifosfato
BH₄	tetrahidrobiopterina
CAM	calmodulina
CaMK	proteína quinasa asociada a calmodulina
CRF	factor liberador de corticotropinas
cNOS	óxido nítrico sintetasa constitutiva
cPKC	proteína quinasa C clásica
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGTA	ácido etilenglicol bis tetracético
eNOS	óxido nítrico sintetasa endotelial
ERK	proteína quinasa regulada por señales extracelulares
FAD	dinucleótido de flavina y adenosina
FBPasa-1	fructosa-1, 6- bifosfatasa

FCS	suero fetal bovino
FMN	mononucleótido de flavina
H-89	{N-[2- ((p-Bromocinnamil) amino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida, 2HCl}
Hepes	ácido 4-(2-hidroxi-etileno)-1-piperazina-etano sulfónico
Hsp	proteína de estrés térmico
IKK	proteína quinasa asociada a IκB
IKKα	proteína quinasa asociada a la subunidad α de IKK
IKKβ	proteína quinasa asociada a la subunidad β de IKK
IL-2	interleuquina 2
iNOS	óxido nítrico sintetasa inducible
IP₃	inositol 1, 4, 5- trifosfato
IκB	proteínas inhibidoras de factores de transcripción
JNK	Jun quinasa
JNKK	proteína quinasa asociada a JNK
kDa	kilodalton
LPS	lipopolisacárido
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	proteína quinasa regulada por señales extracelulares
MEKK	proteína quinasa asociada a MEK
MES	ácido 2-[n-Morfolino] etanesulfónico
NADPH	dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato
NFκB	factor de transcripción nuclear κB

NIK	proteína quinasa inductora de NFκB
nNOS	óxido nítrico sintetasa neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetasa
nPKC	proteína quinasa C nueva
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDK1	piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 1
Pi	fosfato inorgánico
PI(3)K	fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP₂	fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PLC	fosfolipasa C
PMA	forbol 12-miristoato 13-acetato
PMSF	fenil-metil-sulfonil fluoruro
PS	fosfatidil L-serina
PTK	proteína tirosina quinasa
RH	hemocito redondo
SDS	dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS
SH	hemocito expandido
TBS	tampón tris salino
TEMED	tetrametiletilendiamina

TGF β_1	factor de crecimiento transformante β_1
TNF- α	factor de necrosis tumoral α
TTBS	tampón tris salino tween
TβRI	receptor de TGF-β_1 tipo 1
TβRII	receptor de TGF-β_1 tipo 2
TβRIII	receptor de TGF-β_1 tipo 3

Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide

Ana Novas, Asunción Cao, Ramiro Barcia, Juan Ignacio Ramos-Martinez*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus de Lugo, 27002 Lugo, Spain

Received 7 January 2003; accepted 20 May 2003

Abstract

As other marine and land mollusks, mussels have special cells in charge of the immune function called hemocytes. The activation of these cells leads to a series of events that end up in phagocytosis and in secretion of digestive enzymes that eliminate the pathogen. The production of nitric oxide is among the early activation processes. Contrary to what happens in cells of vertebrates and of other species of mollusks, in hemocytes of *Mytilus galloprovincialis*, LPS did not induce secretion of NO to the medium. However, human IL-2 provoked an important increase in NO production. The maximal synthesis of NO was detected after the hemocytes were incubated with the cytokine for 24 h. In both stimulated and non-stimulated cells, Western blotting showed the presence of a protein of 130 kDa, recognized by anti-mouse iNOS. Therefore, the higher production of NO can only be explained as a direct action of some effector upon the nitric oxide synthetase. NO production decreased by the action of H-89, a powerful inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase (PKA). This suggests the involvement of PKA in the pathway of NO synthesis.

© 2003 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Nitric oxide; Hemocytes; Mussel; Immunity

1. Introduction

The immune system of invertebrates lacks the clonal component specific of mammals (Bácher et al., 1995; Ratcliffe, Rowley, Fitzgerald, & Rhodes, 1985) and the cells responsible for the defense are the hemocytes. After the early stage of activation, specific actions such as phagocytosis, secretion of digestive

enzymes and production of superoxide ions take place (Carballal, Lopez, Azevedo, & Villalba, 1997; Pipe, 1992; Söderhall & Cerenius, 1998). Given their operative similarity to the macrophages from vertebrates, the hemocytes from mollusks can be an excellent model to study the molecular operation of the innate immune system (Aderem & Ulevitch, 2000; Janeway & Medzhitov, 2000).

In the presence of LPS or PMA, vertebrate macrophages increase oxygen consumption in order to synthesize NO (Xia & Zweir, 1997); in this way, NO reacts with O_2^- , generating peroxynitrite [ONOO⁻], a more stable radical with a higher bactericide ability (Rosen, Pou, Ramos, Cohen, & Britigan, 1995). From

Abbreviations: FCS, fetal calf serum; IL-2, interleukin-2; LPS, lipopolysaccharide; NEDA, 2-naphthyl-1-ethylenediamine; NO, nitric oxide; PMA, 4 β -phorbol 12-myristate 13-acetate

* Corresponding author. Tel.: +34-982-252303;

fax: +34-982-252195.

E-mail address: bnramos@lugo.usc.es (J.I. Ramos-Martinez).

the point of view of evolution, this ancient molecular mechanism can be considered to have remained from insects and mollusks (Arumugan, Romestand, & Torreilles, 2000; Arumugan, Romestand, Torreilles, & Roch, 2000; Conte & Ottaviani, 1995; Franchini, Fontanili, & Ottaviani, 1995) up to mammals (Aderem & Ulevitch, 2000; Janeway & Medzhitov, 2000).

NO is synthesized by an ensemble of enzymes generically called nitric oxide synthetases. The so-called inducible form or iNOS seems to be the main responsible for NO synthesis in macrophages (Prabhakar, Zeballos, Montoya-Zavala, & Leonard, 1997). Apparently, the same happens in mollusk hemocytes, as suggested by indirect and inhibition assays (Conte & Ottaviani, 1995; Franchini et al., 1995); however, certain authors suggest that LPS does not induce NO production in *Mytilus*, whereas laminarine and PMA do (Arumugan, Romestand, & Torreilles, 2000; Arumugan, Romestand, Torreilles, & Roch, 2000; Gourdon, Guerin, Torreilles, & Roch, 2001).

In hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk, LPS and IL-2 were observed to stimulate the synthesis of the α chain of the IL-2 receptor (Barcia, Cao, Arbeteta, & Ramos-Martinez, 1999). Like NO, this receptor takes part in the immune response.

The present work proposes to study the early activation of hemocytes of the mussel *M. galloprovincialis* Lmk by LPS and IL-2, focussing on NO production.

2. Methods

2.1. Materials

LPS from *E. coli* (Serotype 026:B6), human recombinant IL-2, NADPH, nitrite reductase, monoclonal anti-iNOS from macrophage mouse (N 9657) and NEDA were from Sigma (St. Louis, MO). Bisindolylmaleimide I (BM) and H-89 were from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK) supplied the enhanced chemiluminescence kit (ECL[®]). All other reagents were of highest available quality.

2.2. Collection of mussel hemolymph

Marine mussels (*M. galloprovincialis* Lmk) were collected from a sea farm located at the Ria de Be-

tanzos (NW Spain). The mollusks were placed in tanks containing aerated seawater and transported to the laboratory. Hemocytes were obtained from the adductor muscle (Cao, Mercado, Ramos-Martinez, & Barcia, 2003). Throughout the culture period, cell viability was assayed by the Trypan blue test and the cells were counted in a Neubauer hemocytometer. The cells were cultured for 3 days at 18–20 °C in Leibovitz L-15 medium supplemented with 20.2 g/l NaCl, 0.54 g/l KCl, 0.6 g/l CaCl₂, 1 g/l MgSO₄, 3.9 g/l MgCl₂, 20.8 g/l glucose, 10% FCS, 100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin, 40 µg/ml gentamicin and 0.1 µg/ml amphotericin B at pH 7.0 and 1000 mOsm (Cao et al., 2003).

2.3. "In vitro" effect of LPS or IL-2

Cultured cells (10⁶ cells in each assay) were centrifuged at low speed, resuspended and incubated for different times of assay in FCS-supplemented ALS (Alseve) medium at pH 7.0 and 1000 mOsm. LPS or IL-2 was added at the assay concentrations. Alseve medium contained 20.8 g/l glucose, 8 g/l sodium citrate, 3.36 g/l EDTA and 22.5 g/l NaCl. FCS-supplemented ALS medium contained ALS buffer and 17.4 g/l Arginine, 29.22 µg/ml glutamine, 10% FCS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 40 µg/ml gentamicin and 0.1 µg/ml amphotericin B. Incubation temperature was 18 °C.

2.4. NO determination

The total NO released by the cell culture was determined by measuring the accumulation with Griess reagent (Hortelano, Genaro, & Bosca, 1993; Schulz, Kerber, & Kelm, 1999) as follows: 200 µl of culture medium was incubated with 0.5 Units of nitrite reductase in the presence of 50 µM NADPH and 5 µM FAD. Griess reagent was used to determine nitrite as follows: 1 mM sulfanilic acid and 100 mM HCl (final concentrations) were added to the hemocytes. After incubation for 5 min, samples were centrifuged in an Eppendorf centrifuge and 150 µl of supernatant was transferred to a 96-well microplate. After an early reading of absorbance at 548 nm, 50 µl of naphthylendiamine (1 mM in each assay) was added. The reaction was completed after 15 min of incubation and absorbance at 548 nm was compared with a standard

of NaNO_2 . The absorbance corresponding to time 0 was taken away (Barcia et al., 1999; Cao et al., 2003).

2.5. Western blotting

Aliquots of each sample were used for 10% SDS-PAGE. The proteins separated were transferred to a PVDF membrane at 4°C using a Bio-Rad transfer lot device (100 V/90 min). Non-specific sites were blocked by incubation of membranes with skimmed milk. Horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG was used as secondary antibody for detection by the commercial ECL[®] detection system. Dilution of monoclonal anti-mouse iNOS was 1/750.

2.6. Statistical analysis

All data are expressed as mean and standard deviation (S.D.). Comparison between groups of samples was performed by independent *t*-test or separated measures of variance as appropriate. Specific comparisons between means were done with Student–Newman–Keuls multiple range test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

In all the assays, incubations were performed in FCS-supplemented ALS medium instead of the usual Leibovitz L-15 medium (Cao et al., 2003). This change responded to the spectrophotometric interference between the coloring present in L-15 medium and Griess reagent (Schulz et al., 1999). When comparing culture media and hemocyte viability, statistically significant differences were not before the cells were kept in culture for 20 days of culture. However, cell viability was lower if mussel hemolymph was added instead of FCS (results not shown).

Fig. 1 shows NO production as function of the incubation time of hemocytes with LPS. The production detected between time 0 and 48 h was not statistically significant, including the small peak detected after 6 h of incubation. NO production of hemocytes incubated with IL-2 is also shown. The maximal NO production ($P < 0.005$) was detected at 24 h. The increase in NO production was 10 times higher than the value detected in the control at time 0.

Western blotting with monoclonal anti mouse iNOS of non-stimulated hemocytes and of those incubated either with LPS for 6 h or with IL-2 for 24 h showed

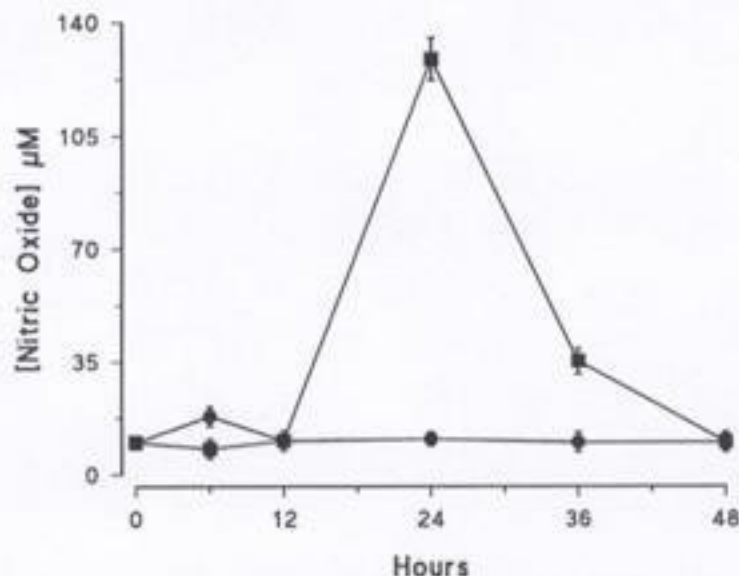


Fig. 1. NO production by hemocytes incubated with LPS or IL-2. Hemocytes from *M. galloprovincialis* Lmk (10^6 cells) were incubated with either 10 ng/ml LPS (●) or 10 µg/ml IL-2 (■) during the times indicated. NO concentration in the culture media was assessed following the technique described in experimental procedures. Values are shown as mean of five assays. Bars are S.D.



Fig. 2. Immunodetection of nitric oxide synthetase using anti-human iNOS antibodies. Protein extract corresponding to 10^6 cells was loaded on each lane. Control; non-stimulated hemocytes. LPS; hemocytes incubated with 10 ng/ml LPS for 6 h. IL-2; hemocytes incubated with 10 μ g/ml IL-2 for 24 h.

Table 1
Effect of different protein kinase inhibitors on the stimulation of NO production by IL-2

	NO concentration (μ M)
Control	9.97 \pm 0.03
IL-2	128.57 \pm 6.50*
IL-2 + H-89	12.46 \pm 0.16**
IL-2 + BM	106.59 \pm 1.06***
LPS	13.28 \pm 2.15 (N.S.)

Control: non-activated hemocytes. IL-2; hemocytes incubated with IL-2 (10 μ g/ml) for 24 h as described in Section 2. LPS; hemocytes incubated with LPS (10 ng/ml) for 6 h. H-89 and BM were added to the cells simultaneously with IL-2 at the concentrations of 100 and 25 nM, respectively. (N.S.) Not statistically significant as compared with control.

* Compared with control $P < 0.001$.

** Compared with IL-2 $P < 0.001$.

*** Compared with IL-2.

a similar band pattern. In all the samples, a majority band of 130 kDa was detected (Fig. 2). This molecular mass is similar to that of iNOS from vertebrates.

Table 1 shows the effect of H-89 on the synthesis of NO induced by IL-2. The inhibition of NO production is statistically significant with respect to NO production in the absence of this specific competitive inhibitor of cAMP-dependent protein kinase (PKA). On the contrary, the use of a specific inhibitor of nPKC or cPKC-like isoenzymes, such as bisindolylmaleimide (BM), did not affect the production of NO by the hemocytes.

4. Discussion

When comparing the results of the stimulation of phagocytes of vertebrates to those obtained from hemocytes of invertebrates, the conclusions about the molecular mechanisms involved in the role of NO synthesis as defensive agent are controversial.

In vertebrates, macrophages and certain cells of the glia generate NO when stimulated by LPS of bacterial walls (Prabhkar et al., 1997; Nakamura, Si, & Kataoka, 2001; Simmonds & Murphy, 1994). NO released to the environment reacts with reactive oxygen metabolites producing peroxynitrite, which is a potent antibacterial agent.

The existence of this model in mollusks is under discussion. Increases in the production of NO by hemocytes of *Mytilus edulis* and *Viviparus ater* were detected when the cells were incubated with LPS (Conte & Ottaviani, 1995; Franchini et al., 1995; Ottaviani, Paemen, Cadet, & Stefano, 1993). The model used in the present work is notably different from that used by the authors mentioned above (Conte & Ottaviani, 1995; Franchini et al., 1995; Ottaviani et al., 1993), in fact, the hemocytes used in their assays are directly extracted from the tissue, and probably affected by molecular elements that induce cell stress (Stefano, Leung, Zhao, & Scharrer, 1989). Such would be the explanation of variability of their results (Conte & Ottaviani, 1995; Franchini et al., 1995; Ottaviani et al., 1993). On the contrary, in the present work, hemocytes were kept in culture for 3 days with the purpose of obtaining a uniform response (Cao et al., 2003), as we expected that response to be less altered by stress. The synthesis of the isoenzymatic form iNOS by means of a mechanism similar to that described in cells of vertebrates may justify this long-time dependent effect (Prabhkar et al., 1997; Nakamura et al., 2001; Simmonds & Murphy, 1994). However, in this work, in both stimulated and non-stimulated hemocytes, western blotting showed the presence of a protein of 130 kDa, recognized by monoclonal anti-mouse macrophages iNOS. The antibody used recognizes the C-terminus in iNOS, which is the binding region to NADPH and remains in all species and enzymes studied (Xie et al., 1994).

IL-2 showed a remarkable ability to stimulate hemocytes of both water and land mollusks (Ottaviani, Franchini, Cassanelli, & Genedani, 1995), provoking increases in cell mobility and phagocytic ability. In *M. galloprovincialis*, activation by IL-2 was previously observed by assessment of the presence of IL-2R α by flow cytometry (Barcia et al., 1999). In the present work, IL-2 was observed to provoke an increase in the synthesis of NO in hemocytes of *M. galloprovincialis*. This process seems to depend on the incubation

time, as the maximal NO synthesis was obtained at 24 h.

PKA inhibition by H-89 affected notably the production of NO. Therefore, there must be a pathway of NO production involving the cAMP-dependent protein kinase. On the other hand, the expression of the IL-2 receptor also depends on PKA activity (Barcia et al., 1999). So, this could relate NO production to the expression of the IL-2 receptor induced by IL-2 and LPS.

According to these early results, the relationships between the pathways of internalization of the signals generated by IL-2 in NO production in hemocytes of *M. galloprovincialis* are currently being the object of our task.

Acknowledgements

This work was supported by the Grants XUGA 26100 PB96 and PGIDT MAR26102PR from the autonomous Government of Galicia (SPAIN). We thank Maria Mosquera for excellent technical assistance.

References

- Aderem, A., & Ulevitch, R. J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, *406*, 782–787.
- Arunagan, M., Romestand, B., & Torreilles, J. (2000). Nitrite released hemocytes from *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Living Resources*, *20*(13), 173–177.
- Arunagan, M., Romestand, B., Torreilles, J., & Roch, P. (2000). In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* hemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *European Journal Cell Biology*, *79*, 513–519.
- Bácher, E., Mialhe, E., Noël, D., Boulo, V., Morum, A., & Rodríguez, L. (1995). Knowledge and prospects in marine mollusks and crustacean immunology. *Aquaculture*, *132*, 17–32.
- Barcia, R., Cao, A., Arbeteta, J., & Ramos-Martínez, J. I. (1999). The IL-2 receptor in hemocytes of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *IUBMB Life*, *48*, 419–423.
- Cao, A., Mercado, L., Ramos-Martínez, J. I., & Barcia, R. (2003). Primary cultures of hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk: Expression of IL-2R α . *Aquaculture*, *216*, 1–8.
- Carballal, M. J., Lopez, C., Azevedo, C., & Villalba, A. (1997). Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *70*, 96–105.
- Conte, A., & Ottaviani, E. (1995). Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. *FEBS Letters*, *365*, 120–124.
- Franchini, A., Fontanili, P., & Ottaviani, E. (1995). Invertebrate immunocytes: Relationship between phagocytosis and nitric oxide production. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *110B*, 403–407.
- Gourdon, I., Guerin, M.-C., Torreilles, J., & Roch, P. (2001). Nitric oxide generation by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Nitric Oxide*, *5*, 1–6.
- Hortelano, J., Genaro, A. M., & Bosca, L. (1993). Phorbol esters induce nitric oxide synthase and increase arginine influx in cultured peritoneal macrophages. *FEBS Letters*, *320*, 135–139.
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2000). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, *20*, 197–216.
- Nakamura, Y., Si, C.-S., & Kataoka, K. (2001). Differential regulation of microglia NO production by protein kinase C inhibitors. *Neurochemistry International*, *38*, 1–7.
- Ottaviani, E., Franchini, A., Cassanelli, S., & Genedani, S. (1995). Cytokines and invertebrate immune response. *Biology of the Cell*, *85*, 87–91.
- Ottaviani, E., Paemen, L. R., Cadet, P., & Stefano, G. B. (1993). Evidence for nitric oxide production and utilization as a bactericidal agent by invertebrate immunocytes. *European Journal of Pharmacology*, *248*, 319–324.
- Pipe, R. K. (1992). Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Developmental and Comparative Immunology*, *16*, 111–122.
- Prabhakar, S. S., Zeballos, G. A., Montoya-Zavala, M., & Leonard, C. (1997). Urea inhibits inducible nitric oxide synthase in macrophage cell line. *American Journal of Physiology*, *273*, C1882–C1888.
- Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F., Fitzgerald, S. W., & Rhodes, C. (1985). Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. *International Review of Cytology*, *97*, 183–350.
- Rosen, G. M., Pou, S., Ramos, C. L., Cohen, M. S., & Britigan, B. E. (1995). Free radicals and phagocytic cells. *FASEB Journal*, *9*, 200–209.
- Schulz, K., Kerber, S., & Keim, M. (1999). Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO $_2^-$ in aqueous and protein-containing samples. *Nitric Oxide*, *3*, 225–234.
- Simmonds, M., & Murphy, S. (1994). Roles of protein kinase in the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Glia*, *11*, 227–234.
- Söderhall, K., & Cerenius, L. (1998). Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, *10*, 23–28.
- Stefano, G. B., Leung, M. K., Zhao, X., & Scharrer, B. (1989). Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*, 626–630.
- Xia, Y., & Zweir, J. L. (1997). Superoxide and nitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*, 6954–6958.
- Xie, Q.-W., Cho, H., Kashiwabara, Y., Baum, M., Weidner, J. R., Elliston, K., Mumford, R., & Nathan, C. (1994). Carboxyl terminus of inducible nitric oxide synthase: Contribution to NADPH binding and enzymatic activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*, 28500–28505.