



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
INSTITUTO DE ACUICULTURA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Identificación de genes implicados en la eliminación de biotoxinas en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: clonación y expresión de los cDNA que codifican para dos proteínas transportadoras ABC de la subfamilia B (proteínas MDR)

Roi Martínez-Escauriaza Arias

Memoria de tesis doctoral para optar al título de doctor

Santiago de Compostela, 2013



D. Antonio Juan Pazos Castelos y D. José Luis Sánchez López,
Profesores titulares del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
de la Universidad de Santiago de Compostela

INFORMAN:

De que la presente Tesis Doctoral titulada: “Identificación de genes implicados en la eliminación de biotoxinas en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: clonación y expresión de los cDNA que codifican para dos proteínas transportadoras ABC de la subfamilia B (proteínas MDR)”, presentada por el licenciado en Biología D. Roi Martínez-Escauriaza Arias para optar al grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela, ha sido realizada en el Laboratorio de Biología Molecular y del Desarrollo, del Instituto de Acuicultura bajo nuestra dirección, y que hallándose concluida, autorizamos su presentación a fin de que pueda ser juzgada ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos la presente en Santiago de Compostela, a 28 de marzo de 2013.

Fdo.: D. Antonio Juan Pazos Castelos D. José Luis Sánchez López
Directores de la tesis



El trabajo de esta Tesis ha sido realizado dentro del Convenio EPITOX, financiado por la Consellería de Innovación e Industria de la Xunta de Galicia: “Episodios tóxicos de origen fitoplanctónico en moluscos bivalvos de Galicia” dentro del Subproyecto 5: “Genes de multirresistencia a xenobióticos (MXR) en moluscos bivalvos: caracterización y determinación de su papel en procesos de desintoxicación de toxinas productoras de DSP” (2008-2011).

Durante la elaboración de esta Tesis Doctoral, Roi Martínez-Escauriaza Arias, estuvo contratado con cargo a dicho convenio entre octubre de 2008 y junio de 2011.





AGRADECIMIENTOS

Quiero manifestar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de una u otra manera, han hecho posible el haber realizado esta tesis y, especialmente, a:

- Mis directores de tesis Antonio y Luis; gracias por ayudarme a llevar a buen puerto este trabajo, por los consejos, sugerencias, correcciones y conocimientos que me habéis aportado. Y, por supuesto, todos los buenos momentos que hemos compartido.
- Malu, por tu asesoramiento, ayuda y consejos a lo largo de estos años.
- Mis compañeros del grupo de Biología Molecular y del Desarrollo, que me acogieron con gran cariño y con los que he compartido grandes momentos. Gracias, Óscar, por todo lo que me enseñaste cuando llegué al grupo, pues todo esto lo tenía totalmente olvidado y fuiste tú quien me fue poniendo al día; Vanessa, por todas las horas que compartimos juntos realizando los experimentos y los análisis; si esto fuese trabajo de uno solo, probablemente aún no se habría acabado; Vero, gracias por enseñarme tu trabajo, que me permitió conocer otras herramientas y otras posibilidades, pero sobre todo por los momentos agradables que hemos compartido estos años; y Crim, también por mostrar otras líneas de investigación y los ratos en los que pudimos colaborar. Pero, en general, gracias a todo el grupo por las horas que nos ha tocado disfrutar juntos, los buenos y malos momentos, las excursiones, viajes, muestreos, desayunos, comilonas y noches de diversión.
- Todos los compañeros que han ido pasando por el laboratorio a lo largo de estos años, a los que hemos podido enseñar alguna cosa y, por supuesto, de los que he aprendido y disfrutado de su compañía.
- Los compañeros del Instituto de Acuicultura, con los que hemos compartido y conversado todos estos años. Especialmente, a las compañeras de planta; al grupo de la “menos uno”; y al grupo de la UCM (Unidad de Control de Moluscos), donde realicé los primeros trabajos con el mejillón.
- La Unidad de Biotoxinas del Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño (INTECMAR) y, en especial, Angeles Moroño y Fabiola Arévalo, por todos los mejillones que aportaron para poder realizar esta tesis.
- El equipo de Episodios Tóxicos del Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA) y, especialmente, Juan Blanco, por la colaboración en este trabajo, al cuantifi-

Agradecimientos

car la concentración de toxinas presentes en las muestras necesarias para llevar a cabo este estudio.

- Toda mi familia, por estar siempre a mi lado, apoyando, aconsejando y dándome ánimos cuando lo necesitaba. En especial, a mi padre, que ha sido el que más ha tenido que soportar los momentos bajos por los que he pasado, en los que me ofreció su comprensión y me dio fuerzas para continuar.
 - Agar, la mayor responsable de que empezara esta tesis y que durante muchos años compartió los buenos y malos momentos que acompañaron la realización de este trabajo.
 - Todos mis amigos, a los que no sé cómo agradecer todos los momentos que disfrutamos juntos y haberme ayudado a salir de la agotadora rutina de la tesis. Gracias por los viajes compartidos, las escapadas y todas las actividades que hemos hecho juntos. Sin ellas, probablemente esta tesis no estaría acabada.
 - El grupo de Pesquerías Lejanas del Instituto Español de Oceanografía de Vigo (IEO), por brindarme la oportunidad de trabajar con ellos, lo que me permitió empezar esta tesis. Pero, en especial, quiero agradecer las experiencias que he vivido gracias a los embarques, donde he conocido personas encantadoras y pasado momentos inolvidables.
 - Aquella gente que he ido conociendo a lo largo de estos años, con los que me he encontrado debido a la realización de esta tesis, en reuniones, cursos y congresos; por todas las experiencias que he compartido con ellos.
 - Manolo, por ayudarme en darle buena presencia a este trabajo.
- Y, especialmente, a mi madre, que siempre estará en mi recuerdo.

ABREVIATURAS

- 18S*: 18S RNA ribosomal
A: Adenina
Å: Angstrom
Aa: Aminoácido
ABC: ATP-Binding Cassette
ACNA: Agua central nor-atlántica
act: actina
Amp: Ampicilina
ANOVA: Análisis de varianza
APROMAR: Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos
ASP: Amnesic Shellfish Poisoning
ATP: Adenosin Trifosfato
AZP: Azaspiracid Poisoning
AZA: Azaspirácido
BCRP: Breast Cancer Resistance Protein
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
C: Citosina
cDNA: DNA complementario
CFP: Ciguatera Fish Poisoning
Cq: Quantification cycle
CTX: Ciguatoxinas.
cox1: Citocromo c oxidasa subunidad I
CYP450: Citocromo P450
DA: Ácido domoico
DEPC: Dietil Pirocarbonato
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNasa: Desoxirribonucleasa
dNTP: Desoxidorribonucleótido trifosfato.
DSP: Diarrhetic Shellfish Poisoning
DTX: Dinofisitoxinas
E: Eficiencia de la amplificación por PCR
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EMBL-EBI: European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute
et al.: “y colaboradores”

Abreviaturas

- FAO: Food and Agriculture Organization
g: Gravedad
g: gramos
G: Guanina
gapdh: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
HSP: Heat Shock Proteins
IFREMER: Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
INTECMAR: Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño
IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
JACUMAR: Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos
kB: kilobase
kDa kiloDalton
l: Litro
LB: Luria-Bertani
LD: Límite de detección
m: Metros
M: Molar
MAGRAMA: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
MDR: Multidrug-Resistance (Multirresistencia frente a fármacos)
MIQE: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
mRNA: RNA mensajero
MRP: Multidrug Resistance Proteins (Proteína de multirresistencia frente a fármacos)
MSD: Membrane Spanning Domain
MT: Metalotioninas
MTX: Maitotoxinas
MUSCLE: Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation
MXR: Multixenobiotic resistance (Multiresistencia frente a xenobióticos)
NBD: Nucleotide Binding Domain
NBF: Nucleotide Binding Fold
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NSP: Neurotoxic Shellfish Poisoning
nd4: NADH deshidrogenasa subunidad 4
NUP: Nested Universal Primer

Abreviaturas

- OA: Ácido okadaico
OESA: Observatorio Español de Acuicultura
ORF: Open Reading Frame (Campo abierto de lectura)
 p : Valor de significación
pb: Pares de bases
PBP: Proteína periplasmática de unión
PCR: Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
P-gp: P-glicoproteína
Pi: Fosfato inorgánico
PSP: Paralytic Shellfish Poisoning
PTX: Pectenotoxina.
 r : Coeficiente de correlación
RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends
REST: Relative Expression Software Tool
RFU: Relative Fluorescence Unit (Unidad arbitraria de fluorescencia)
RNA: Ácido ribonucleico
RNasa: Ribonucleasa
rpm: Revoluciones por minuto
rps4: 40S proteína ribosomal S4
rps27: Proteína de fusión ubiquitina - proteína ribosomal S27
RT-PCR: Transcripción inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa
RT-qPCR: Transcripción inversa seguida de PCR en tiempo real cuantitativa
 s : Segundos
SD: Desviación estándar
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SPSS: Statistical Package for the Social Sciences
SPX: Espirólido
STX: Saxitoxina
T: Timina
TBE: Tampón Tris-ácido bórico - EDTA
tif5a: Factor de iniciación de la traducción 5A
Tm: Temperatura de fusión
TMD: Dominios Transmembrana
UPM: Universal Primer Mix

Abreviaturas

- UV: Ultravioleta
WHOI: Woods Hole Oceanographic Institution
X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YTX: Yesotoxina



R E S U M E N

Identificación de genes implicados en la eliminación de biotoxinas en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: clonación y expresión de los cDNA que codifican para dos proteínas transportadoras ABC de la subfamilia B (proteínas MDR)

La multirresistencia frente a xenobióticos (MXR), en organismos acuáticos expuestos a toxinas o contaminantes antropogénicos, es un fenómeno equivalente a la multirresistencia frente a fármacos (MDR), estudiada en líneas celulares tumorales resistentes a drogas anticancerígenas. Un xenobiótico es toda sustancia extraña o ajena a las que proceden de la composición normal de un organismo vivo. Un ejemplo serían las biotoxinas marinas, entre ellas el ácido okadaico (principal toxina de tipo diarreico - DSP). El proceso de desintoxicación tiene lugar frecuentemente en varias fases, en las que participan una serie de enzimas y transportadores de membrana. Este sistema funciona de forma prácticamente universal, desde arqueobacterias hasta la especie humana, donde ha sido fuertemente estudiada, debido a su implicación en tratamientos tumorales. Últimamente, se han realizado diversos estudios en organismos marinos, donde se analiza el funcionamiento y la inducción de este sistema frente a diversos contaminantes.

Los genes de multirresistencia frente a xenobióticos (MXR) codifican para una serie de proteínas transportadoras de membrana, pertenecientes a la superfamilia de proteínas ABC (*ATP-Binding Cassette*), encargadas del transporte activo de la toxina o sus derivados, hacia el exterior de las células. Una de las encargadas de realizar esta función es la P-glucoproteína (P-gp, ABCB o MDR).

La presencia de un sistema MXR en bivalvos, sumado a la estructura molecular del ácido okadaico, que cuadra perfectamente en el diseño de la amplia variedad de metabolitos, que se unen y son trasladados por este transportador, sugiere su consideración como un posible sustrato de la P-gp. Esto permite proponer la hipótesis de que este transportador podría estar implicado en la desintoxicación celular de moluscos durante los episodios tóxicos.

Resumen

En esta investigación se ha buscado la presencia de proteínas MDR en varios tejidos del mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), mediante el estudio de los genes que las codifican. Para ello, se utilizaron determinadas herramientas de biología molecular, como la transcripción inversa, seguida por una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y de RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends-PCR*). Finalmente, los fragmentos obtenidos fueron clonados y secuenciados.

Se ha conseguido completar la secuencia del cDNA que codifica para dos proteínas de tipo MDR o P-gp, en el mejillón *M. galloprovincialis*, que presentaban los motivos conservados característicos de esta familia. En el gen *mdr1*, el cDNA está formado por 4271 pb y codifica para una proteína de un tamaño de 1307 aminoácidos, mientras que el cDNA del gen *mdr2* consta de 4417 pb, que origina una proteína de 1367 aminoácidos.

También se realizó un estudio de la expresión de estos genes en los diferentes tejidos del mejillón (glándula digestiva, branquia y manto), además de un análisis a lo largo de la evolución de un proceso de intoxicación-desintoxicación por toxinas DSP, que tuvo lugar en 2010 en las rías gallegas. Para ello, se utilizó la técnica de RT-qPCR, usando cebadores específicos de los fragmentos que se quieren amplificar. Para normalizar los resultados, se llevó a cabo un análisis de un grupo genes de referencia [NADH deshidrogenasa subunidad 4 (*nd4*); gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*); citocromo c oxidasa subunidad I (*cox1*); proteína de fusión ubiquitina - proteína ribosomal S27 (*rps27*); factor de iniciación de la traducción 5A (*tif5a*); 40S proteína ribosomal S4 (*rps4*); actina (*act*) y 18S RNA ribosomal (*18S*)], con el fin de encontrar aquellos que se mantengan más estables, a lo largo del experimento. Para ello, se usaron tres programas informáticos, que clasifican los genes examinados según su estabilidad: geNorm, NormFinder y BestKeeper.

Tras los análisis con los tres programas, se propusieron los genes de referencia más estables, que se deberían usar para la normalización en cada uno de los casos. Serían:

Resumen

- para los tres tejidos en conjunto (glándula digestiva, branquia y manto): *gapdh*, *rps4*, *rps27* y *cox1*;
- para glándula digestiva y branquia: *gapdh*, *rps4* y *cox1*;
- para manto: *gapdh*, *rps4* y *rps27*.

Tras comparar la expresión entre los tres tejidos, se observó que, para la *mdr1*, no se encontraron diferencias significativas, mientras que para la *mdr2* era mayor en la branquia que en los otros dos tejidos. Esto puede ser debido a que es el primer lugar donde se produce el contacto entre las toxinas y el organismo, actuando como un tejido barrera que impide la entrada de este tipo de moléculas y expulsando aquellas que han sido asimiladas.

Por otra parte, al analizar la expresión de estos genes durante el proceso de intoxicación-desintoxicación del mejillón por ácido okadaico, se observó que el gen *mdr1* estaba significativamente más expresado, tanto en branquia como en la glándula digestiva, de los mejillones expuestos a altas concentraciones de toxinas DSP, en relación al control sin toxina, mientras que esta sobreexpresión, para *mdr2*, solo pudo ser observada en la branquia. En el manto no se encontraron cambios significativos de los niveles de expresión para ninguno de los genes.

Estos resultados revelan que, probablemente, las proteínas transportadoras MDR actúen en las branquias como una barrera frente a las biotoxinas, evitando su entrada y eliminándolas hacia el exterior. Además, la sobreexpresión de *mdr1* en glándula digestiva podría estar relacionada con una función protectora, mediante la expulsión directa de tóxicos, y con el transporte de metabolitos tras los procesos de biotransformación que tienen lugar en este órgano, donde se acumulan principalmente las biotoxinas marinas en moluscos bivalvos.



ABSTRACT

Identification of genes involved in the elimination of biotoxin in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: Cloning and expression of the cDNAs encoding two ABC transporter proteins of subfamily B (MDR proteins)

Multi-xenobiotic resistance (MXR) in aquatic organisms exposed to toxins or anthropogenic pollutants is a phenomenon equivalent to the multi-drug resistance (MDR) studied in tumor cell lines resistant to anti-cancer drugs. A xenobiotic is any compound foreign or external to those from the normal composition of a living organism. One example would be marine biotoxins, including okadaic acid (mainly diarrhetic toxin type - DSP). The process of detoxification often takes place in several stages involving a number of enzymes and membrane transporters. This system works almost universally, from archaea to the human species, where it has been heavily studied because of their involvement in tumor treatments. Recently, several studies were done, related to their functioning in marine organisms, where the function and induction of this system against various contaminants have been analyzed.

Multixenobiotic resistance genes (MXR) encode for a set of membrane transporter proteins, belonging to the superfamily of ABC proteins (*ATP binding cassette*), responsible for the active transport of toxins or their derivatives outwards from the cells. One of the implicated for carrying out this function is the P-glycoprotein (P-gp, ABCB or MDR).

The presence of a MXR system in bivalves and the okadaic acid molecular structure, which fits perfectly in the design of the wide variety of metabolites for these transporters, suggests that it should be considered as one possible substrate of P-gp. This permits us to hypothesize that this conveyor could be involved in cellular detoxification of mollusks during toxic episodes.

In this research, the presence of MDR proteins in various tissues of mussels (*Mytilus galloprovincialis*), through the study of the genes coding for this protein, has been demonstrated. To do this, specific molecular biology tools were

Abstract

employed, such as reverse transcription followed by a polymerase chain reaction (RT-PCR) and a RACE-PCR (*rapid-amplification of cDNA Ends PCR*). Finally obtained fragments were cloned and sequenced.

The complete cDNA sequence that codifies for two MDR proteins (P-gp) in the mussel *M. galloprovincialis* has been obtained and the conserved motifs characteristic of this family have been localized. In the *mdr1* gene, the cDNA is composed of 4271 bp and codifies for a protein of 1307 amino acids, while the *mdr2*'s cDNA consists of 4417 bp that originate a 1367 amino acids protein.

Also, a study of the expression of these genes in different tissues (digestive gland, gill and mantle) was performed, plus an analysis during the evolution of a DSP toxin intoxication-detoxification process, which took place in 2010 in the Galician "rias". This has been done using the technique of RT-qPCR, using specific primers that amplify expected fragments. To normalize the results, an analysis of a set of reference genes [*NADH dehydrogenase subunit 4 (nd4)*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh)*, *cytochrome c oxidase subunit I (cox1)*, *ubiquitin fusion protein - ribosomal protein S27 (rps 27)*, *translation initiation factor 5A (tif5a)*, *ribosomal protein small subunit, protein 4 (rps4)*, *actin (act)* and *18S ribosomal RNA (18S)*] was performed in order to identify those that remain more stable throughout the experiment. We employed three computer programmes (NormFinder, geNorm, and BestKeeper), that examined and classified the genes according to their stability.

After the analysis with the programs it was proposed that the most stable reference genes to be used for normalization were:

- for all three tissues (digestive gland, gill and mantle): *gapdh*, *rps4*, *rps27* and *cox1*;
- for digestive gland and gills: *gapdh*, *rps4* and *cox1*;
- for mantle: *gapdh*, *rps4* and *rps27*.

Abstract

After comparing the levels of expression between the three tissues, it was observed that for the *mdr1* no significant differences were found, whereas the *mdr2* was greater in the gill than in the other two tissues. This may be due to the fact that it is the first place where contact occurs between the toxins and the body, acting as a barrier tissue that prevents the entry of some molecules and expelling those which have been assimilated.

Moreover, when the expression of these genes in the process of detoxification was analyzed, it has been observed that the *mdr1* gene was significantly more expressed in gills and in the digestive gland when mussels were exposed to high DSP toxin concentrations when compared to the ones without toxin, while this overexpression was only observed in the gill for *mdr2* gene. In the mantle there were no significant changes in expression levels for any of the genes.

These results reveal that probably MDR transporter proteins operate in gills as a barrier against biotoxins, preventing their entry and removing them outwards. Furthermore, the overexpression of *mdr1* in the digestive gland could be related to a protective function, through the direct expulsion of toxics, and with the transport of metabolites after biotransformation processes, which take place in this organ where marine biotoxins mainly accumulate in bivalve mollusks.



CONTENIDOS

1. Introducción	5
1.1. Cultivo del mejillón en Galicia	6
1.1.1. Historia de la miticultura	10
1.1.2. Distribución	13
1.1.3. Cultivo del mejillón en batea	14
1.1.4. Clasificación, biología, anatomía y fisiología del mejillón <i>Mytilus galloprovincialis</i> .	16
1.2. Toxinas marinas	23
1.2.1. Toxinas responsables de intoxicaciones paralizantes (Paralytic Shellfish Poisoning - PSP)	29
1.2.2. Toxinas responsables de intoxicaciones amnésicas (Amnesic Shellfish Poisoning - ASP)	30
1.2.3. Toxinas neurotóxicas (Neurotoxic Shellfish Poisoning - NSP)	31
1.2.4. Toxinas lipofílicas	31
1.2.4.1. Responsables de intoxicaciones diarreicas	31
1.2.4.1.1. Toxinas responsables de intoxicaciones diarreicas (Diarrhetic Shellfish Poisoning - DSP)	31
1.2.4.1.2. Azaspirácidos (Azaspiracid Poisoning - AZP)	36
1.2.4.2. Responsables de intoxicaciones no diarrogénicas	36
1.2.4.2.1. Pectenotoxinas (PTX)	36
1.2.4.2.2. Yesotoxinas (YTX)	36
1.2.4.2.3. Espirólidos (SPX)	37
1.2.5. Ciguatera (Ciguatera Fish Poisoning - CFP)	37
1.2.6. Palitoxina	37
1.3. Resistencia frente a xenobióticos	38
1.3.1. Captación	38
1.3.2. Difusión y almacenamiento.	39
1.3.3. Respuesta y depuración del organismo frente a la presencia de xenobióticos	41
1.3.3.1. Proteínas de estrés	42
1.3.3.2. Mecanismos de metabolización.	46
1.4. Proteínas ABC	49
1.4.1. Subfamilia ABCB	54
2. Objetivos.	63
3. Materiales y métodos	65
3.1. Material.	65
3.2. Preparación de medios	69
3.3. Clonación, secuenciación y caracterización	74
3.3.1. Muestras	74
3.3.2. Extracción del RNA Total	75

Contenidos

3.3.3. Síntesis de cDNA	78
3.3.4. Diseño de cebadores	79
3.3.5. Obtención de fragmentos de cDNA de las proteínas MDR, por PCR y <i>rapid amplification of cDNA ends</i> o RACE PCR.	81
3.3.6. Electroforesis de los productos de amplificación y purificación de las bandas obtenidas	86
3.3.7. Clonación de los productos de PCR purificados	89
3.3.8. Minipreps de las bacterias recombinantes	93
3.3.9. Confirmación de la presencia de los insertos	94
3.3.10. Stock en glicerol	96
3.3.11. Secuenciación	96
3.3.12. Análisis informático	97
3.3.13. Análisis filogenético	99
3.4. Expresión	100
3.4.1. Introducción	100
3.4.2. Muestras	107
3.4.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.	109
3.4.4. Genes de referencia, diseño de los cebadores y eficiencia de la PCR.	110
3.4.5. RT-qPCR	113
3.4.6. Análisis de los datos	114
4. Resultados	117
4.1. Obtención de los fragmentos, análisis de las secuencias y caracterización de los genes <i>mdr</i> en <i>Mytilus galloprovincialis</i>	117
4.2. Estudio filogenético de las proteínas MDR	143
4.3. Concentración de ácido okadaico en la glándula digestiva	145
4.4. Expresión de los genes <i>mdr</i>	147
4.4.1. Selección y análisis de los genes de referencia	148
4.4.2. Estabilidad de los genes de referencia	156
4.4.2.1. geNorm	156
4.4.2.2. NormFinder	158
4.4.2.3. BestKeeper	160
4.4.3. Comparación de la expresión entre tejidos de los genes <i>abcb</i> (<i>mdr</i>).	163
4.4.4. Comparación de la expresión de los genes <i>abcb</i> durante la presencia de un afloramiento de fitoplancton tóxico	168
4.4.5. Análisis de correlación	183
5. Discusión	187
5.1. Obtención del cDNA que codifica para proteínas MDR y caracterización de estas	187
5.2. Análisis de genes de referencia	196

Contenidos

5.3. Estudios de expresión de los genes que codifican para las proteínas MDR.....	203
5.4. Perspectivas de futuro	220
6. Conclusiones	227
7. Bibliografía.....	229
8. Anexo	259
8.1. Esquemas de los protocolos.....	259
8.2. Alineamiento de secuencias	264
8.3. Árboles filogenéticos	268
8.4. Medidas, geles y gráficas de la RT-qPCR.....	272





1. INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores problemas que están teniendo lugar en las costas de todo el mundo, relacionado con el cultivo de moluscos bivalvos, reside en el aumento general de la aparición de afloramientos fitoplanctónicos. Estos están favorecidos por el notable incremento de la contaminación de aguas costeras y el aumento paulatino de la temperatura asociado al cambio climático (FAO, 2004b).

Los mejillones presentan una elevada capacidad para captar nutrientes suspendidos en la columna de agua. Algunas especies de fitoplancton, del que se alimentan, producen compuestos tóxicos que se acumulan en sus tejidos, pudiendo causar diferentes tipos de intoxicación en el hombre. Dependiendo del tipo de toxina, se pueden producir desde molestias digestivas hasta graves trastornos neurológicos, pudiendo en algunos casos provocar la muerte. Una de las toxinas con mayor aparición en el medio y, por tanto, con mayor presencia y acumulación en animales filtradores, es la DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*).

Es, probablemente, el problema más grande con el que se encuentra la industria del mejillón, debido a su alta incidencia y su prolongada presencia. Numerosas investigaciones y diversos medios se han invertido en tratar de reducir la presencia y los efectos negativos de esta toxina. En Galicia, como en otras comunidades de España y otros países, se dispone de un complejo sistema de vigilancia y control, que permite a la administración tomar las medidas necesarias para controlar la extracción de las distintas especies. Por ahora, la depuración de los mejillones intoxicados, transfiriéndolos a aguas sin presencia de organismos tóxicos con el fin de reducir la concentración de la toxina, se ha considerado como una alternativa, ya que al menos esta reubicación evita que sigan asimilando estos compuestos. Aun así, no es un método empleado frecuentemente, debido a que no suele ser viable económicamente.

Las respuestas fisiológicas de los mejillones frente a la presencia de compuestos tóxicos en el medio todavía son poco conocidas. Se están realizando numerosos estudios dirigidos a conocer las dinámicas de las microalgas tóxicas en el

1. Introducción

medio y a conocer mejor los sistemas de acumulación y eliminación de toxinas en los moluscos, con el fin de poder acelerarlos y conseguir algún método efectivo para favorecer su depuración.

Los estudios clásicos de metabolismo están siendo complementados en los últimos años con nuevas técnicas moleculares que se han desarrollado considerablemente. Esto podría ayudar a identificar y conocer los genes implicados en la síntesis de proteínas relacionadas en los procesos de eliminación de biotoxinas.

El objetivo de esta tesis es profundizar en el conocimiento sobre la actuación de algunos mecanismos de protección y eliminación de compuestos tóxicos de los tejidos del mejillón, concretamente con el estudio de una subfamilia de las proteínas transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*), la P-glucoproteína, MDR o ABCB. Poder comprender el papel que llevan a cabo y saber cómo activarla o favorecer su expresión probablemente ayude a reducir la concentración de toxinas en los individuos, reflejándose en un beneficio económico muy significativo para el sector.

1.1. Cultivo del mejillón en Galicia

El término acuicultura se refiere a aquellas actividades cuyo objetivo es el desarrollo, crecimiento, comercialización y producción de organismos acuáticos, tanto de aguas dulces, salobres o saladas (Barnabé, 1991). Este proceso implica el control de todas las etapas del desarrollo, desde los primeros estadios hasta el adulto, facilitando a los organismos cultivados todos los medios necesarios para su crecimiento y engorde. El cultivo de algas, crustáceos, peces y moluscos constituye los grandes grupos de interés acuícola.

La acuicultura tuvo sus inicios hace aproximadamente 4.000 años, pero en los últimos 60 años la acuicultura mundial ha sufrido un espectacular incremento, con el objetivo de complementar la creciente demanda mundial de productos pesqueros que no puede ser cubierta por la pesca extractiva. De una producción inicial de menos de un millón de toneladas anuales, a comienzos

1. Introducción

de la década de 1950, se ha pasado en 1980 a producirse en todo el mundo 4,7 millones de toneladas de productos pesqueros de la acuicultura, aumentando a 13,1 millones de toneladas en el año 1990. Sin embargo, en el año 2001 ya se producían, a nivel mundial, alrededor de 35 millones de toneladas de pescado, crustáceos y moluscos de acuicultura, llegando a alcanzarse unos volúmenes de producción próximos a los 50 millones de toneladas en 2007 (FAO, 2012a). Véase la Tabla 1:

Tabla 1. Producción mundial de acuicultura (Tn). (FAO, 2012a).

	2001	2002	2003	2004	2005
Peces, crustáceos, moluscos	34.613.626	36.785.687	38.915.093	41.907.649	44.295.996
Todos los organismos (+ plantas acuáticas)	44.328.731	47.383.215	50.316.826	54.572.287	57.814.929
	2006	2007	2008	2009	2010
Peces, crustáceos, moluscos	47.290.220	49.937.426	52.946.447	55.714.357	59.872.600
Todos los organismos (+ plantas acuáticas)	61.381.486	64.931.046	64.931.046	73.070.123	78.879.653

En la actualidad, la acuicultura representa casi la mitad del alimento acuático mundial, según cifras facilitadas por la FAO (2004a). En el año 2004 la producción acuícola a nivel mundial fue de unos 42 millones de toneladas, mientras que de la pesca extractiva se obtuvieron 90 millones de toneladas. Se prevé que en el año 2020 el 50% de los productos pesqueros para consumo humano se obtendrán de la acuicultura. Como se puede observar en la Figura 1 (Vela & Ojeda, 2007), de la página siguiente, la tendencia es un incremento paulatino de los productos de acuicultura, que en un futuro próximo igualarán los volúmenes obtenidos con la pesca extractiva. En base a estos datos, la FAO estima que la acuicultura es uno de los sectores con mayor potencial de crecimiento si se pretende garantizar el suministro adecuado de alimentos de origen acuícola, ya que últimamente se ha observado un estancamiento de la pesca extractiva.

1. Introducción

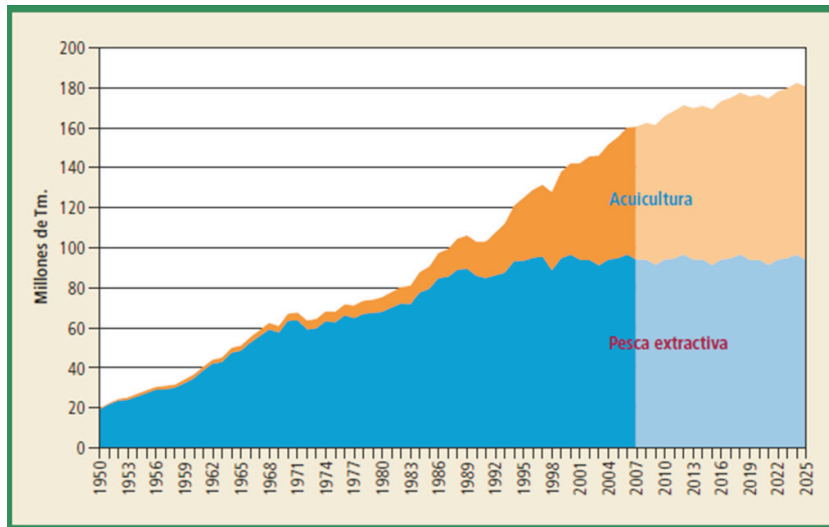


Figura 1: Producción mundial de productos pesqueros (Vela & Ojeda, 2007).

La riqueza de recursos marinos renovables de las rías gallegas y su producción es singular, siendo muy superior a la mayoría de otras regiones del mundo. Dicha productividad obedece a características como la luz, turbidez o la concentración de nutrientes (Figueiras *et al.*, 2002).

En Galicia se producen varias especies de moluscos bivalvos de gran interés económico, como la ostra, berberecho, almeja, vieira, navaja o zamburiña, pero sin duda el más importante es el mejillón. El cultivo del mejillón en España se realiza principalmente en Galicia, superando el 95% de la producción total del país (Figura 2).

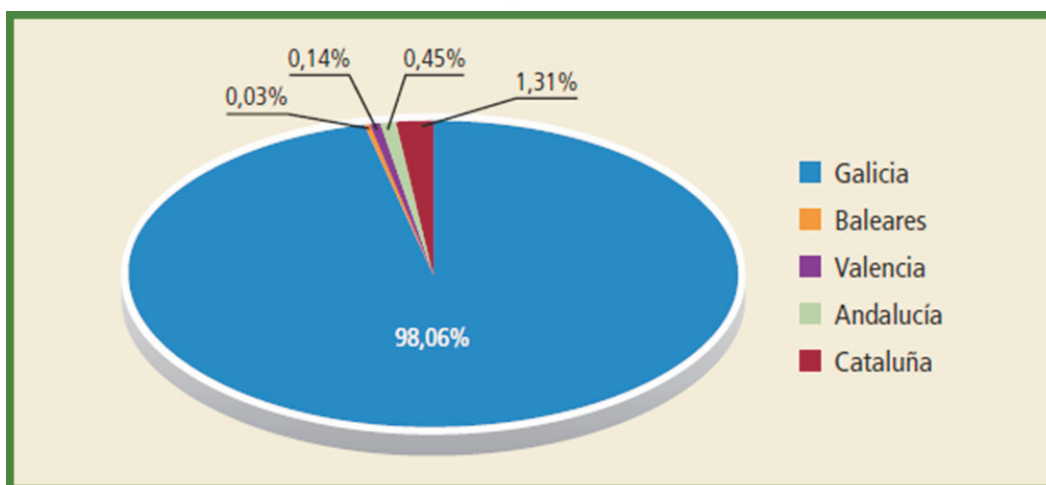


Figura 2: Distribución porcentual de la producción de mejillón por Comunidades Autónomas en 2005 (Vela & Ojeda, 2007. Fuente: Jacumar).

1. Introducción

Comparando la producción mitícola por comunidades autónomas desde los años 2007 hasta el 2010 (Tabla 2), podemos observar la elevada producción de mejillón en la comunidad gallega, oscilando en torno a las 200.000 toneladas, prácticamente la producción total de estos moluscos en España.

Tabla 2. Datos de producción (Tn) del mejillón *M. galloprovincialis*, por comunidades (MAGRAMA 2012).

CCAA	2007	2008	2009	2010
Galicia	208.208,40	188.831,03	225.101,45	212.034,51
Cataluña	2.753,15	3.275,98	2.971,88	3.804,85
Andalucía	788,11	592,23	328,31	758,88
Com. Valenciana	872,62	81,97	83,29	199,89
Baleares	44,43	77,97	113,55	149,34
Total	212.646,71	192.859,16	228.596,26	216.745,07

La especie que se cultiva de mejillón en Galicia es *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Constituye un elemento clave en la ecología de las aguas costeras de Galicia, cobrando gran importancia en el ecosistema de las rías. La industria mejillonera explota esta especie para su cultivo con alrededor de 3.400 bateas, que desde el año 1998 obtienen una producción que fluctúa en torno a valores próximos a 250.000 toneladas, aunque estos últimos años se ha visto reducida, disminuyendo hasta las 200.000 toneladas (Figueiras, 2002; Labarta *et al.*, 2004; MAGRAMA 2012). Véase la Figura 3, en la página siguiente.

Esto sitúa a España, y especialmente a Galicia, como un gran productor de mejillón a nivel mundial, con un volumen de facturación anual que oscila entre 110 y 150 millones de euros en primera venta a sus clientes más directos: depuradoras, cocederos y conserveras. Esta cifra sería mucho mayor si se tuviese en cuenta el conjunto de actividades que dependen en mayor o menor medida de la existencia del sector mejillonero.

Se calcula que genera 7.000 empleos directos e induce otros 8.000 puestos de trabajo indirecto, generando en el conjunto de la cadena un valor superior a

1. Introducción

los 470 millones de euros anuales (Franco, 2006b; Consello Regulador do Meixillón de Galicia, 2010; OESA, 2011).

(Tn)

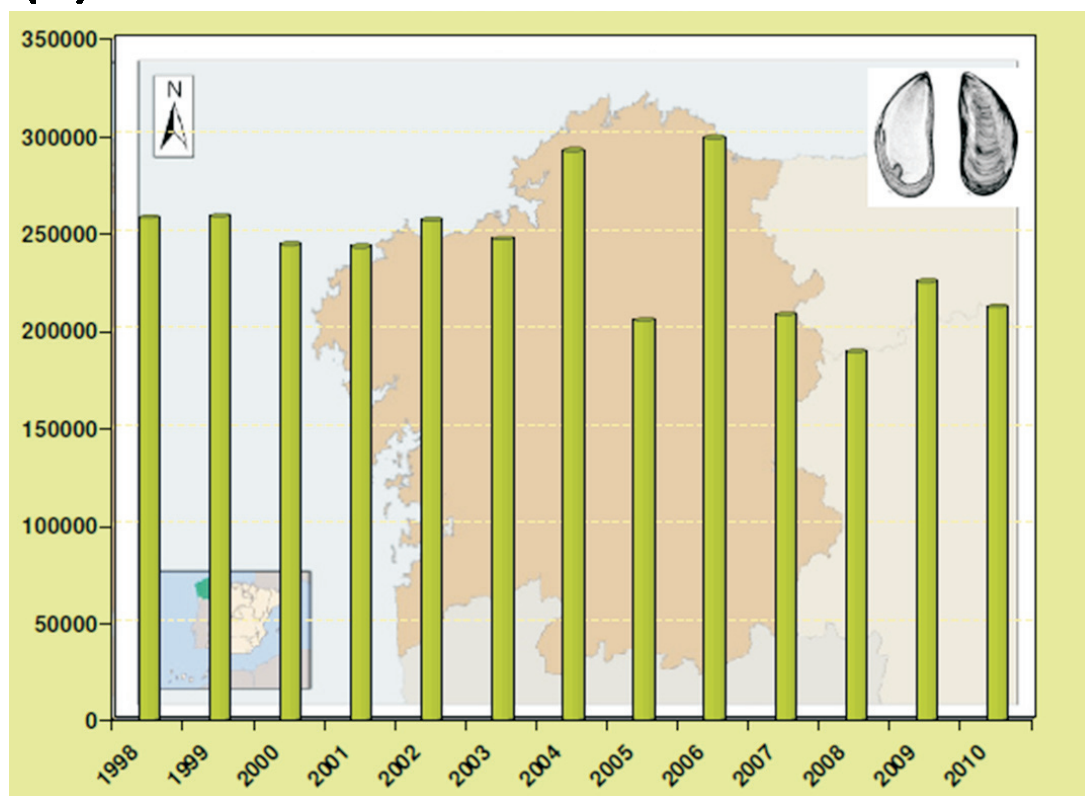


Figura 3. Producción acuícola (Tn) de *M. galloprovincialis* en Galicia. 1998-2010. (MAGRAMA 2012).

1.1.1. Historia de la miticultura

La evidencia más temprana de consumo de mejillones en Galicia se produce alrededor del siglo cuarto a.C., cuando los nativos de entonces tenían grandes depósitos donde tiraban los restos de conchas (conchales). También fueron hallados en las proximidades de los pueblos romanos del primer siglo d.C. Hasta principios del siglo XIX, la única forma de miticultura (cultivo del mejillón) conocida en Europa se daba en Francia, donde se llevaban a cabo “cultivos en empalizadas” o *bouchots*. Esta metodología se hizo extensiva y fue ampliamente utilizada hasta que, hacia 1860, en Holanda, tras el colapso de los bancos naturales, se comenzó un nuevo sistema conocido como “cultivo en

1. Introducción

parque”, donde las semillas se fijaban en el fondo hasta alcanzar una talla comercial (FAO, 2012b).

En el año 1846, se inició en España el “cultivo en suspensión”, a pesar de que no cobró realmente importancia hasta un siglo después (Barnabé, 1991). A principios del siglo XX, el mejillón comenzó a ser un recurso importante en España. Su cultivo se remonta a 1901 y 1909 en Tarragona y Barcelona, usando postes de madera similares a los empleados en Francia. Este sistema fue desechado, a favor de estructuras flotantes o bateas, donde cuelgan cuerdas en las que se fijan los juveniles y permanecen adheridos hasta que obtienen su talla comercial.

En Galicia, a principios de 1940, D. Alfonso Ozores Saavedra, intentó criar mejillones sobre estacas clavadas imitando el método usado en tierras francesas, pero con malos resultados. Lo intentó de nuevo en el año 1945, basándose en las estructuras flotantes con cuerdas suspendidas que había visto en Cataluña, a las que se adherían los mejillones, siendo esta vez el intento un gran éxito (Duran *et al.*, 1990).

El cultivo del mejillón se desarrolla rápidamente, alcanzando 400 bateas censadas en 1956, repartidas entre la ría de Vigo (Bueu e Redondela), la de Arousa (Villagarcía, Cambados, Grove, A Pobra do Caramiñal), ría de Sada y ría de Muros (Duran *et al.*, 1990). La expansión de bateas por las rías gallegas fue tan rápida que en 1961 se legisló la explotación de los viveros de cultivo para limitar nuevos fondeos de bateas. En 1967 se contabilizaban 2600.

A partir de aquí, la expansión de esta actividad fue más lenta, llegando a las 3386 bateas en 1983, hasta las 3481 que referencia Pérez Camacho en 1992. La distribución de la propiedad de las concesiones para bateas en las rías gallegas tuvo lugar en 1997. La mayor concentración se localiza en la ría de Arousa, con un 68,68% del total, seguida por las rías de Vigo y Pontevedra, con un 14,32% y 10,37%, respectivamente. Finalmente, en las ría de Muros-Noia se encuentran un 3,54% y en la de Ares-Betanzos un 3,09% (Consello Regulador

1. Introducción

Mexillón de Galicia, 2010). Véase gráfico de los polígonos mejilloneros en Galicia con el número y distribución de bateas en la Figura 4.

Galicia posee un total de 1.309 km. de costa, que se caracteriza por poseer una serie de valles sumergidos que forman parte de un cauce fluvial y reciben el nombre de “rías”. El movimiento que se produce entre las capas superficiales y profundas de agua, los afloramientos del agua central nor-atlántica (ACNA) y el arrastre de nutrientes en las épocas de lluvia, hacen que el enriquecimiento de las aguas sea el necesario para favorecer el desarrollo de fitoplancton (Fernández-Reiriz y Labarta, 2004). Estas características convierten a las costas gallegas en el escenario perfecto para el cultivo del mejillón, dándose uno de los más elevados rendimientos de producción de proteína por unidad de área (se alcanza un tamaño comercial de entre 70 y 95 mm, en unos 17 meses) (Consello Regulador Mexillón de Galicia, 2010).

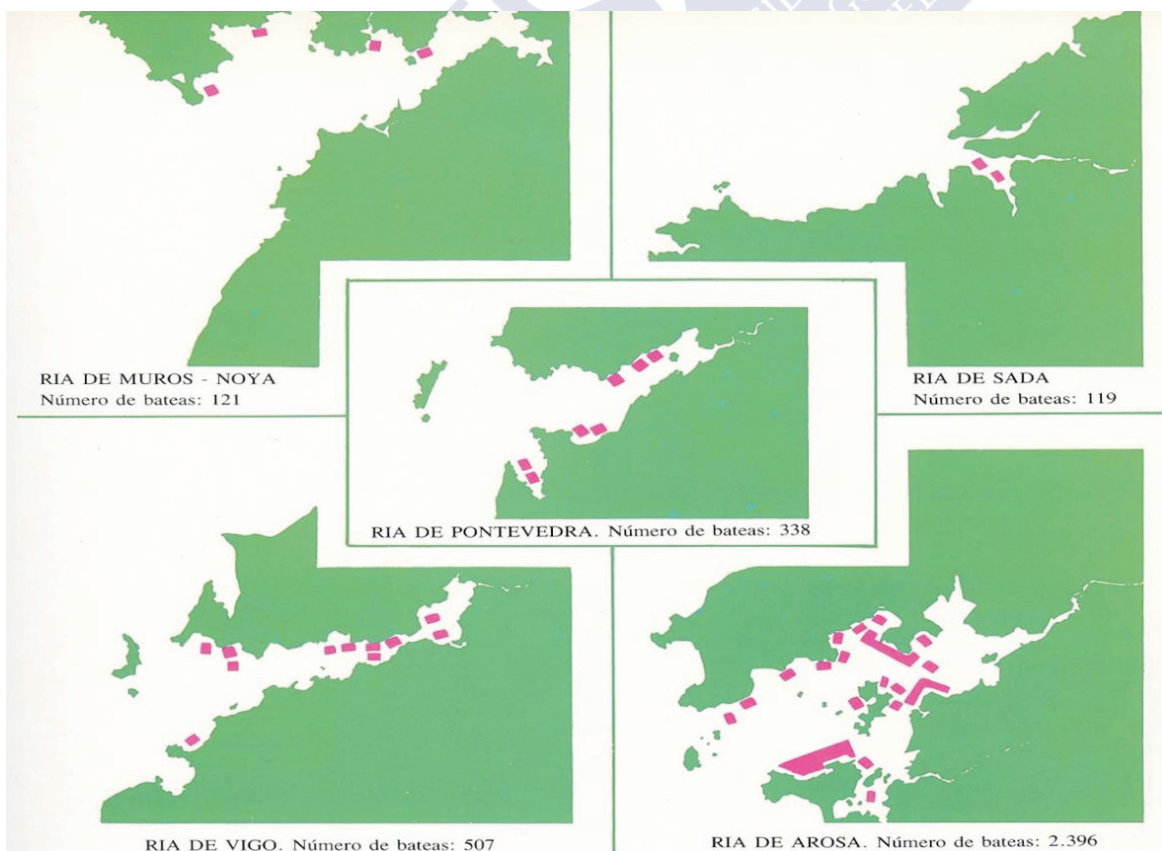


Figura 4. Número y distribución de bateas en las rías gallegas (Durán *et al.*, 1990).

1. Introducción

1.1.2. Distribución

El rango exacto de distribución de *M. galloprovincialis* es difícil de evaluar debido a la confusión por su parecido con *M. edulis*, siendo la costa atlántica una zona donde cohabitan e hibridan produciendo descendencia fértil (Beaumont *et al.*, 2004). Se distingue de este por la línea basal de la concha, que es cóncava; las valvas son más altas y menos angulares en el margen superior, tendiendo a crecer más; y el borde del manto es más oscuro (FAO, 2012b), aunque basarse en las características morfológicas puede llevar a equívocos, debido a la variedad de formas adoptadas según el hábitat y los factores ambientales. Desde 1995, pruebas basadas en técnicas genéticas resultan ser más útiles para realizar diagnósticos fiables en la distinción de estas especies (Beaumont *et al.*, 2004).

Es originario del océano Atlántico en el Sur de Europa (desde el sur de la Bretaña francesa) y Norte de África, y en el mar Mediterráneo (Sanjuan *et al.*, 1994). Se puede ver el mapa de distribución en la Figura 5 (IFREMER):

El rango de introducción se extiende desde Sudáfrica, este y oeste de Norte América, hasta noreste de Asia. Probablemente, su dispersión se debió a la fijación en fondos de los cascos de algunos barcos (Branch & Steffani, 2004).



Figura 5. Distribución europea de *Mytilus edulis* (en naranja) y *Mytilus galloprovincialis* (en azul), en rayado la zona de hibridación. (En Ifremer, <http://en.aquaculture.ifremer.fr/Sectors/Mollusc-sector-/Discoveries/Mussels>).

1. Introducción

El mejillón ocupa dos biotopos diferentes. Los embriones y larvas son planctónicas moviéndose en la columna de agua, hasta su metamorfosis y fijación, convirtiéndose en organismos sésiles que viven fijados a la superficie del sustrato. Presentan una gran plasticidad biológica, lo que les permite colonizar hábitats variados, a menudo viviendo en grandes densidades.

Normalmente se localizan sobre zonas rocosas en el intermareal, soportando grandes variaciones con los cambios producidos por las mareas. Están adaptados a zonas donde se producen importantes cambios en el medio, teniendo una gran tolerancia frente a diferencias de temperatura, salinidad, humedad, o disponibilidad de oxígeno y alimento.

Su distribución, principalmente, se localiza en sustratos duros en zonas poco profundas. En la zona superior, se encuentra limitado por la resistencia que presenten a la temperatura y la desecación, cuando hay marea baja, mientras que, en profundidad, el factor más importante es la presencia de predadores y la competencia con otros organismos.

En Galicia se han encontrado individuos a profundidades de hasta 15 m, aunque en otros lugares se han localizado ejemplares que superaban los 30 m. También se han descrito mejillones que habitan fondos arenosos de zonas estuarinas (Duran *et al.*, 1990).

1.1.3. Cultivo del mejillón en batea

El cultivo se realiza en las bateas, que se encuentran en polígonos que están separados entre sí de 80 a 100 m. Están nombrados con una letra y se subdividen en cuadrículas numeradas, correspondientes a la posición de fondeo de cada batea. Están formadas por un emparrillado de madera, suspendido por una serie de flotadores, y de donde cuelgan las cuerdas a las que se fija el mejillón. Se fondean mediante una gruesa cadena a uno o dos puntos.

A partir de 1989, la Xunta de Galicia estableció que, en cada batea, con una extensión máxima permitida de 500 metros cuadrados, están permitidas un

1. Introducción

máximo de 500 cuerdas de unos 10-12 metros de longitud (Figueras, 2007). Las cuerdas llevan intercaladas cada 40 cm los palillos, que sirven para distribuir el peso de los mejillones y que no se desprendan.

El cultivo se inicia con la obtención de la semilla, que se recolecta de los bancos naturales en las rocas o mediante colectores colgados de las bateas. Con la semilla obtenida se hace el “encordado”, envolviendo la semilla alrededor de la cuerda con ayuda de una fina red de acetato vegetal y/o algodón. Esta se descompondrá a los pocos días de estar en el agua, tiempo suficiente para que la semilla de mejillón se haya fijado a la cuerda mediante el biso. A los 4-6 meses, el mejillón alcanza un tamaño de 4-5 cm, el peso de la cuerda aumenta mucho y se produce una excesiva concentración de individuos, por lo que el crecimiento del mejillón se ralentiza.

Entonces se realiza el “desdoble” que consiste en repartir el mejillón de las cuerdas en otras nuevas, con lo que la densidad de individuos disminuye, favoreciendo su crecimiento. El número de cuerdas de desdoble que se obtienen a partir de una cuerda de semilla varía entre 2 y 4. Este proceso se realiza preferentemente entre los meses de junio a octubre. A continuación, tras un periodo de engorde de 8-14 meses, se realizará la cosecha. Cuando el mejillón alcanza la talla comercial (7-10 cm) y hay unos 15 kilos de mejillón por metro de cuerda, se izan las cuerdas con grúas. Una vez fuera del agua, se usan unos cepillos para separar las piñas de mejillón de las cuerdas. Finalmente se llevan a las máquinas clasificadoras donde se lavan los mejillones y se separan en diferentes tallas. Por último, se embolsan para enviar a las depuradoras y conserveras (Durán *et al.*, 1990; Figueras, 2007).

La recogida del mejillón tiene lugar durante todo el año, aunque dependerá principalmente de su contenido en carne y, por tanto, con la temporada de reproducción, procurando evitar su retirada en la época de desove, que, aunque tiene lugar prácticamente durante todo el año, muestra dos picos, uno en primavera y otro en otoño (Durán *et al.*, 1990). La duración del proceso de cultivo, desde la recogida de la semilla hasta su retirada, es de 17 meses, aunque puede variar, dependiendo de diversos factores.

1. Introducción

Las estaciones de depuración, donde se acondicionan los mejillones (para reducir su carga bacteriana), los distribuyen a plantas de procesado (donde se transforman en productos enlatados o congelados); o a mercados centrales, desde los cuales son vendidos al consumidor. Un porcentaje se envía a mercados fuera de España, principalmente a Italia, Francia y Alemania. Al comienzo del cultivo de mejillón, en España el consumo nacional era limitado, pero ahora ha superado las 100.000 toneladas anuales, principalmente como mejillones frescos.

1.1.4. Clasificación, biología, anatomía y fisiología del mejillón “*Mytilus galloprovincialis*”

La rama de la taxonomía clasifica al mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) en las siguientes categorías: reino Animalia, phylum Mollusca, clase Bivalvia (Linnaeus, 1758), subclase Pteriomorpha (Beurlen, 1944), orden Mytiloidea (Ferussac, 1822), familia Mytilidae (Rafinesque, 1815), género *Mytilus* (Linnaeus, 1758).

La rama de los moluscos es el filo más numeroso del reino animal, después de los artrópodos, agrupando animales de una gran diversidad morfológica, fisiológica y ecológica. Está compuesta de 7 clases (solenogastros, caudofoveados, polioplacóforos, gasterópodos, cefalópodos, lamelibranquios o bivalvos y escafópodos), con más de 80 familias. Solo la clase de los bivalvos agrupa más de 6000 especies vivas. El mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) pertenece a la clase de los bivalvos, a la familia Mytilidae y del género *Mytilus*, de los que se han descrito una gran variedad de especies diferentes. Muchas de ellas se están cultivando en numerosos puntos del mundo.

El mejillón, como el resto de bivalvos, carece de esqueleto interno. Su cuerpo se encuentra protegido por la concha, formada por dos valvas simétricas unidas por un ligamento y articuladas por 3-4 dientes que permiten su apertura y cierre (charnela). La concha es triangular con el extremo posterior semicircular, y el punto más alto se halla en el extremo anterior de la valva. La superficie externa de las valvas es de color negro azulada y está surcada por líneas fi-

1. Introducción

tando un color variable de blanquecino a naranjado, dependiendo del sexo y su estado de desarrollo. Recorriendo longitudinalmente la abertura ventral, se observa un órgano musculoso y robusto con forma de lengüeta, el pie, en cuya parte posterior se encuentra situada la glándula que segrega el bisco, estructura de fijación compuesta por filamentos de estructura proteica.

Desplegando los lóbulos del manto, se aprecian cuatro láminas delgadas, estriadas y de color anaranjada-violeta. Son las branquias, que, además de tener un papel respiratorio, sirven como el principal órgano recolector de alimento. El aparato filtrador se compone de dos branquias que están formadas por dos demibranquias (interna y externa), dividiendo la cavidad paleal en inhalante (entre las branquias y el manto) y exhalante (cara interna de las branquias). Cada demibranquia está formada a su vez por dos lamelas (ascendente y descendente), adoptando una forma parecida a una W (Durán *et al.*, 1990; Pérez Camacho, 1992; Figueras, 2007).

Las lamelas están formadas por filamentos alargados que presentan zonas ciliadas y que, por sus movimientos, crean y mantienen la circulación del agua en la cavidad paleal. Los cilios latero-frontales presentan un movimiento efectivo opuesto a los cilios laterales y están involucrados en la retención de partículas. La banda frontal se encarga de transportar partículas hacia el surco ventral, que une las lamelas y que, en último término, transporta el material retenido hacia los palpos labiales y finalmente a la boca, donde son ingeridas. Este mecanismo de captura y transporte de partículas se conoce como *cirral trapping* (Riisgård & Larsen, 2001).

Las branquias filtran y seleccionan las partículas alimenticias que se encuentran en suspensión en el agua. La dieta incluye bacterias, fitoplancton, microzooplancton y materia orgánica en suspensión. El material particulado es transportado hacia los palpos labiales y la boca mediante corrientes de agua creadas por los cilios que recubren las branquias. Las partículas seleccionadas, que constituyen el alimento, pasan al sistema digestivo donde son asimiladas. Los mejillones son capaces de regular la cantidad de alimento ingerido, aumentando la velocidad de filtración si hay poco alimento, o disminuyéndola si

1. Introducción

hay mucho. Cuando la concentración de partículas es baja, todo el material es ingerido, mientras que si aumenta se puede dar una saturación, en la que parte del material es retirado de la boca y expulsado por los palpos labiales; son las pseudoheces (Durán *et al.*, 1990). Además, durante la filtración, se lleva a cabo una cierta selección, descartando partículas muy pequeñas ($<3 \mu\text{m}$) y muy grandes ($>80 \mu\text{m}$). También tienen la habilidad de seleccionar e ingerir partículas específicas de una mezcla de alimento, siendo retenidas en mayor cantidad células fitoplanctónicas frente a partículas de detritos en suspensión (Ward *et al.*, 1998).

El aparato digestivo comienza con la boca, una abertura transversal en la parte posterior del cuerpo y rodeada por dos pares de palpos labiales, con forma de cuatro lengüetas amarillas. Esta da acceso a un esófago muy corto que desemboca en el estómago. En él se observa un largo divertículo ciego, el saco del estilo cristalino, que hace girar el alimento disgregándolo y diluyéndolo con enzimas. Del estómago parten unos canales que se ramifican y terminan en una infinidad de túbulos ciegos: son los divertículos digestivos, que forman alrededor de él una masa parduzca conocida como glándula digestiva o hepatopáncreas. El intestino se une por su parte anterior al saco del estilo cristalino y termina en el recto, que atraviesa el ventrículo del corazón (Figura 7). El ano se

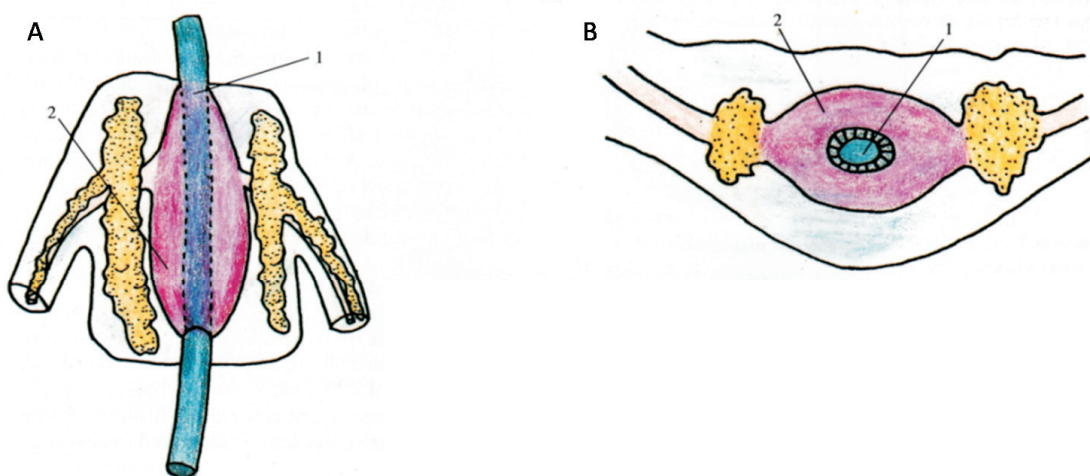


Figura 7: a) Situación del intestino atravesando la cavidad pericárdica; b) Corte transversal de la cavidad pericárdica, donde se observa el tubo intestinal (Pérez Camacho, 1992); 1. Intestino; 2. Corazón.

1. Introducción

encuentra situado cerca del sifón exhalante, bajo el músculo aductor posterior (Durán *et al.*, 1990; Pérez Camacho, 1992).

Aunque las branquias juegan un papel extremadamente importante en la alimentación del molusco, son ante todo órganos respiratorios. La incesante movilidad de los cilios provoca la entrada del agua rica en oxígeno que atraviesa las láminas branquiales donde se produce el intercambio de gases, debido a la amplia superficie de contacto del agua con la abundante irrigación sanguínea. Es aquí donde se realiza la mayor parte de la oxigenación de la sangre, aunque también el manto participa en la respiración, gracias a un intercambio directo de los gases del agua circundante con el tejido (Durán *et al.*, 1990; Pérez Camacho, 1992).

El sistema circulatorio tiene como función distribuir el oxígeno y el alimento por todo el cuerpo, y recoger el anhídrido carbónico y los restos de desecho. Se caracteriza por ser abierto (sin vasos definidos) y presentar un corazón en posición dorsal, rodeado por una membrana transparente (pericardio) y formado por dos aurículas posteriores y un ventrículo anterior. De él salen dos arterias (anterior y posterior) que se ramifican por todo el cuerpo, acabando en los senos lagunares, de donde parten las venas hacia las branquias para oxigenarse y finalmente volver de nuevo al corazón.

La “sangre” es incolora y se conoce como hemolinfa. Contiene hemocianina, un pigmento respiratorio que presenta una pobre capacidad para el transporte del oxígeno. En la hemolinfa también se encuentran unas células de gran tamaño conocidas como amebocitos, capaces de fagocitar partículas del alimento (Pérez Camacho, 1992). En las aurículas, se encuentran los podicitos, que son unas células encargadas de la selección de sustancias de desecho, para ser vertidas a la cavidad pericárdica (Peteiro *et al.*, 1990).

El sistema excretor está constituido por las glándulas pericárdicas, a donde llegan los compuestos de desecho transportados por la hemolinfa, drenada por los nefridios en forma de U, donde se completa la excreción, expulsando los

1. Introducción

residuos del animal a la cavidad paleal, para ser eliminados con el flujo de agua al exterior (Peteiro *et al.*, 2007, Pérez Camacho, 1992).

El sistema nervioso controla el funcionamiento del organismo. Está integrado por tres pares de ganglios (cerebrales, viscerales y pedales) conectados entre sí por un par de largos cordones nerviosos y de los que salen numerosos nervios hacia los demás tejidos del animal. Es un sistema descentralizado en el que la respuesta a diferentes estímulos se lleva a cabo a nivel local o gangliar (Pérez Camacho, 1992).

También presentan varios órganos sensitivos, como los tentáculos del borde del manto que permiten detectar las variaciones de la composición del agua gracias a sus células sensoriales y quimiorreceptoras; los estatocistos responsables del equilibrio y, gracias a unos ojos rudimentarios (ocelos), son sensibles a los cambios de luz. También presentan el osfradio, que está encargado de detectar la calidad del agua que circula por el interior del animal (Peteiro *et al.*, 2007, Durán *et al.*, 1990).

Son animales dioicos, presentan sexos separados y ocasionalmente se pueden dar casos de individuos hermafroditas. La joroba de Polichinela, donde están las gónadas, invadirá el manto en el momento de la reproducción, por lo que en estado adulto la gónada se encuentra extendida de forma difusa en el manto. Está constituida por una multitud de folículos, que se unen formando una serie de ramificaciones que desembocan en el poro genital. En las paredes de los folículos se forman, según el sexo, ovocitos o espermatozoides.

Antes del primer año, alcanzan la primera madurez sexual. En ese tiempo, ciertos cambios en el medio provocan que los productos genitales sean expulsados primero a la cavidad paleal a través del poro genital y, posteriormente, al medio exterior a través del sifón exhalante, donde tendrá lugar la fecundación. Aunque es posible encontrar mejillones con las gónadas maduras durante todo el año, solamente hay dos épocas de puesta, precedidas de una maduración sexual: una en primavera y otra en otoño (Durán *et al.*, 1990).

1. Introducción

En general, para que se inicie la puesta, es preciso de un estímulo externo, como la subida de temperatura, variaciones de la salinidad o cantidad de alimento. Normalmente los machos son los primeros en liberar gran cantidad de espermatozoides, sirviendo como estimulación química de los otros machos y de las hembras, que también expulsaran los ovocitos al medio. La puesta puede realizarse de golpe o en varias fases, pero, cuando acaba, el mejillón habrá perdido casi la mitad de su materia orgánica, entrando en fase de reposo sexual y presentando el manto rugoso y de color traslúcido (Pérez Camacho, 1992).

Tras la fecundación externa en el mar, comenzarán las distintas fases del desarrollo embrionario, con la formación del cigoto. El embrión sufre una serie de cambios, dando lugar a una conformación espiral de los blastómeros hasta la formación de la blástula, después de unas 5-6 horas; a continuación, tiene lugar la gastrulación y las células se reorganizan en tres capas primordiales (endodermo, mesodermo y ectodermo).

Transcurridas 24 horas, el embrión se convierte en una larva ciliada nadadora o larva trocófora, en la cual se distinguen un par de flagelos. Los cilios se alargan formando una estructura en forma de corona conocida como velo. La primera larva veliger es del tipo charnela recta (larva D) y presenta un velo ciliado retráctil y un par de flagelos centrales, que se extienden fuera de las valvas durante la natación.

A este estado le sigue la larva veliger umbonada, que se alcanza a los 11 días, aproximadamente, y está caracterizado por la notable disminución del tamaño del velo ciliado, al igual que la capacidad natatoria larval en la columna de agua. Al final de la vida larvaria se alcanza el estado pediveliger, donde se observa la presencia de un pie bien desarrollado y funcional, continuamente extendido fuera de las valvas, que le permitirá reptar y desplazarse. La fijación tendrá lugar cuando la larva encuentre un lugar adecuado para desarrollarse. En este momento el velo desaparece y el animal adquiere la forma típica de mejillón adulto, sujetándose al sustrato por medio del biso (Durán *et al.*, 1990; Figueras, 2007; Ruíz *et al.*, 2008). Se representa el ciclo en la Figura 8:

1. Introducción

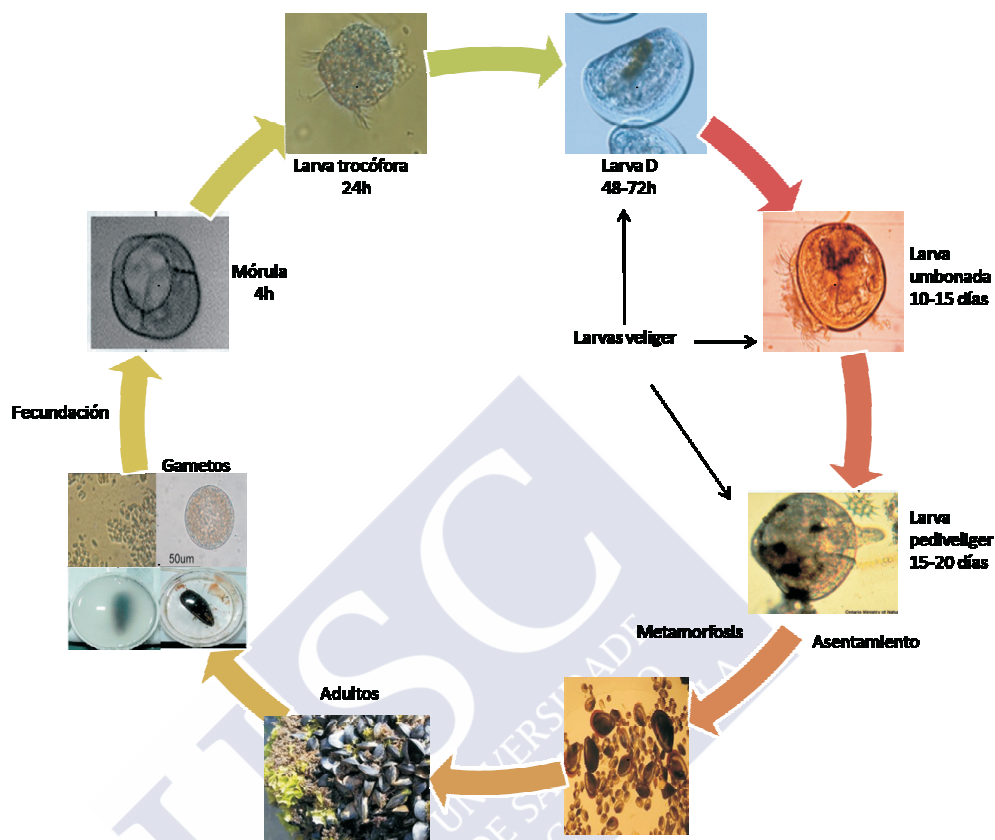


Figura 8: Ciclo reproductivo de *Mytilus galloprovincialis* (modificado de Peteiro *et al.*, 2007).

1.2. Toxinas marinas

Los afloramientos o *blooms* de microalgas marinas constituyen la base para todos los organismos que viven en el mar: La mayoría de las veces no presentan efectos perjudiciales para el medio. Estos afloramientos o purgas de mar son un fenómeno natural de proliferación fitoplanctónica, que se dan en las costas de todo el mundo.

Se puede observar la amplia distribución global de blooms tóxicos de las toxinas PSP en 2005 en la Figura 9 y DSP en el año 2008 en la Figura 12. Tienen lugar bajo determinadas condiciones, donde las microalgas marinas comienzan a multiplicarse rápidamente originando las llamadas “mareas rojas” (Hallegraeff *et al.*, 1995). Este término se puede prestar a equívocos ya que mu-

1. Introducción

chas de ellas no son rojas, sino pardas, anaranjadas, verdosas o incluso episodios que no producen coloración del agua (Franco, 2006a).

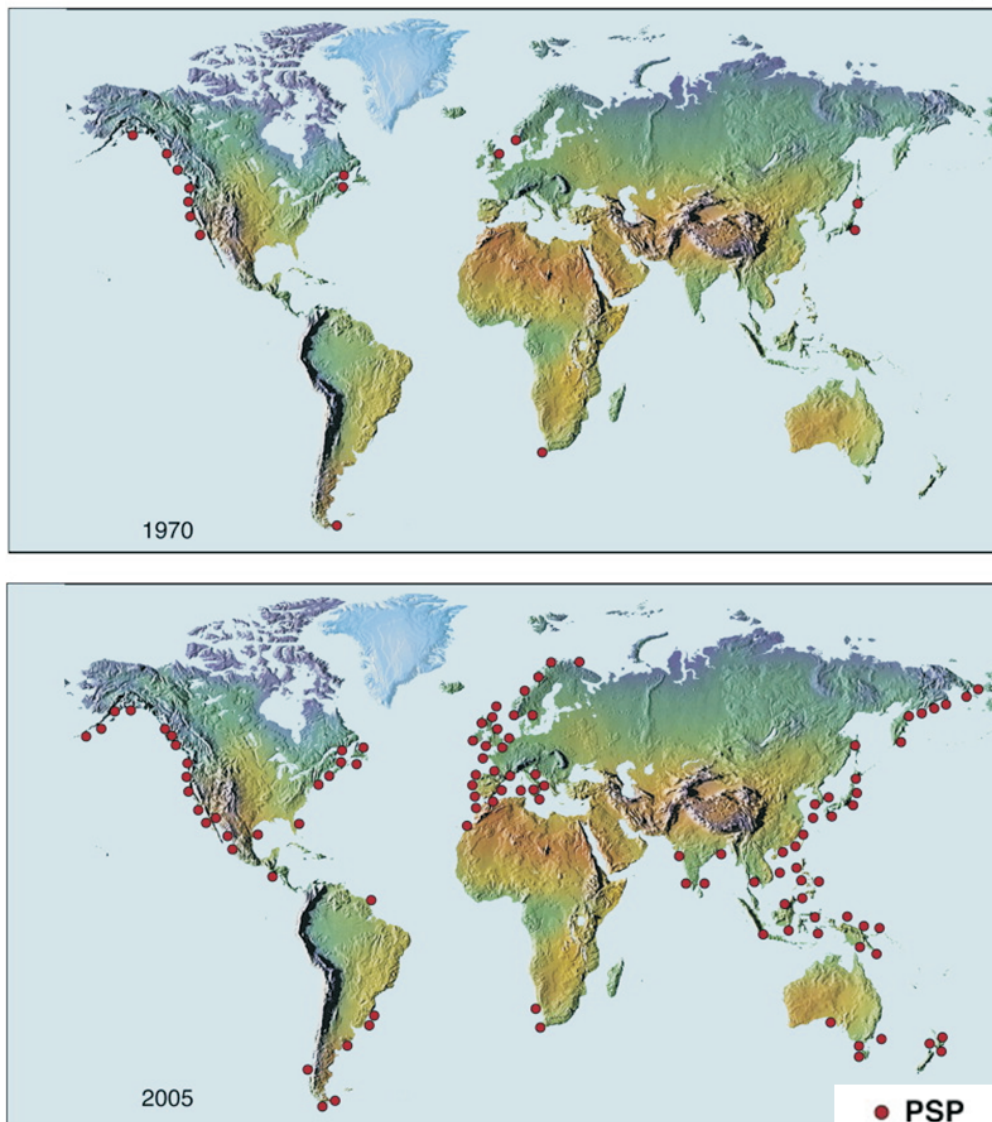


Figura 9. Expansión global en la distribución mundial de PSP. Evolución desde 1970 a 2005. (Anderson, 2009; WHOI - Woods Hole Oceanographic Institution).

Asimismo, no todas son portadoras de toxinas, siendo algunas inocuas en lo que a toxicidad se refiere, aunque pueden provocar grandes daños al originarse un gran consumo de oxígeno, pudiendo provocar la muerte por asfixia de algunos organismos (Durán *et al.*, 1990). Incluso durante la noche, el abundante anhídrido carbónico emitido puede hacer descender bruscamente el pH del agua provocando graves daños en algunas especies (Franco, 2006a).

1. Introducción

En la mayoría de los casos, los afloramientos planctónicos se deben a cambios en las condiciones climáticas. Las proliferaciones masivas de microalgas capaces de originar una purga de mar son debidas a que coinciden en el medio las condiciones idóneas para que se produzca el fenómeno. Dependerán de las corrientes, temperatura, turbidez y salinidad del agua, concentración de nutrientes disueltos, vientos e iluminación.

El afloramiento en las rías se produce por una serie de factores. El más importante es el giro anticiclónico del Atlántico norte (anticiclón de las Azores), que afecta a Galicia con vientos del nordeste. Estos vientos empujan hacia el océano las capas superficiales próximas a la costa, favoreciendo que el agua del fondo emerja para reemplazarlas.

Esta agua emergente es muy rica en nutrientes y puede contener grandes cantidades de quistes de dinoflagelados que están en fase de latencia. Una vez el afloramiento es menos intenso, habrá aguas tranquilas con temperaturas moderadas y salinidad elevada. Es entonces cuando los quistes germinan y comienzan a crecer y a dividirse (Corral, 1992).

En la Figura 10 (ver página siguiente), se puede observar la típica situación meteorológica y oceanográfica en la costa gallega durante un afloramiento fitoplanctónico. En verano, los vientos del Norte favorecen el ascenso de aguas ricas en nutrientes próximas a la costa, provocando el afloramiento de microalgas, mientras que durante el invierno los vientos del suroeste arrastran las corrientes superficiales, siendo repuestas por aguas más templadas y con mayor concentración de materia orgánica.

Las condiciones que se dan a finales de verano y en otoño, en Galicia, favorecen la formación de los afloramientos (Durán *et al.*, 1990). Son un fenómeno completamente natural, aunque se ha observado un aumento en la frecuencia y concentración de especies productoras de toxinas en las dos últimas décadas. Esto se ha atribuido al aumento de la actividad antropogénica, con el consecuente incremento de materia orgánica en las áreas costeras, y a unas mayo-

1. Introducción

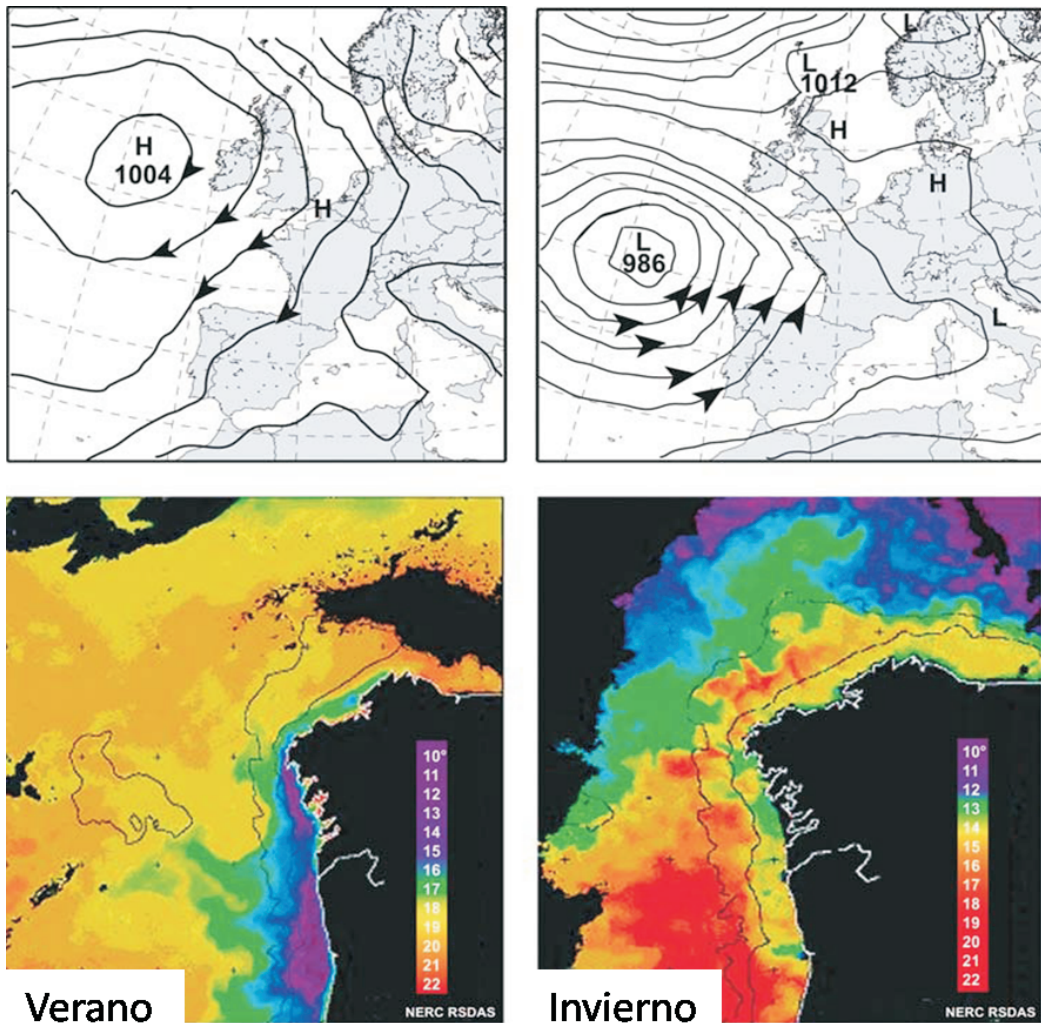


Figura 10. Típica situación meteorológica y oceanográfica en la costa gallega durante un afloramiento fitoplanctónico (modificada a partir de Kudela *et al.*, 2005).

res temperaturas en el medio debidas al cambio climático (Hallegraeff, 1993; van Dolah, 2000).

El impacto de los afloramientos de fitoplancton tóxicos es evidente, afectando a los recursos marinos, como en el caso de la miticultura. Los episodios tóxicos están constituidos por organismos planctónicos portadores de endotoxinas, las cuales son retenidas por los moluscos que actúan como bioacumuladores.

Estos se convierten en vectores que transfieren los tóxicos a niveles superiores de la cadena trófica, es decir, se transmiten a los seres humanos y otros preda-

1. Introducción

dores, a través del consumo de individuos contaminados (Franco, 2006a). Se puede observar el ciclo de intoxicación por consumo de bivalvos en la Figura 11 (Amengual, 1989):

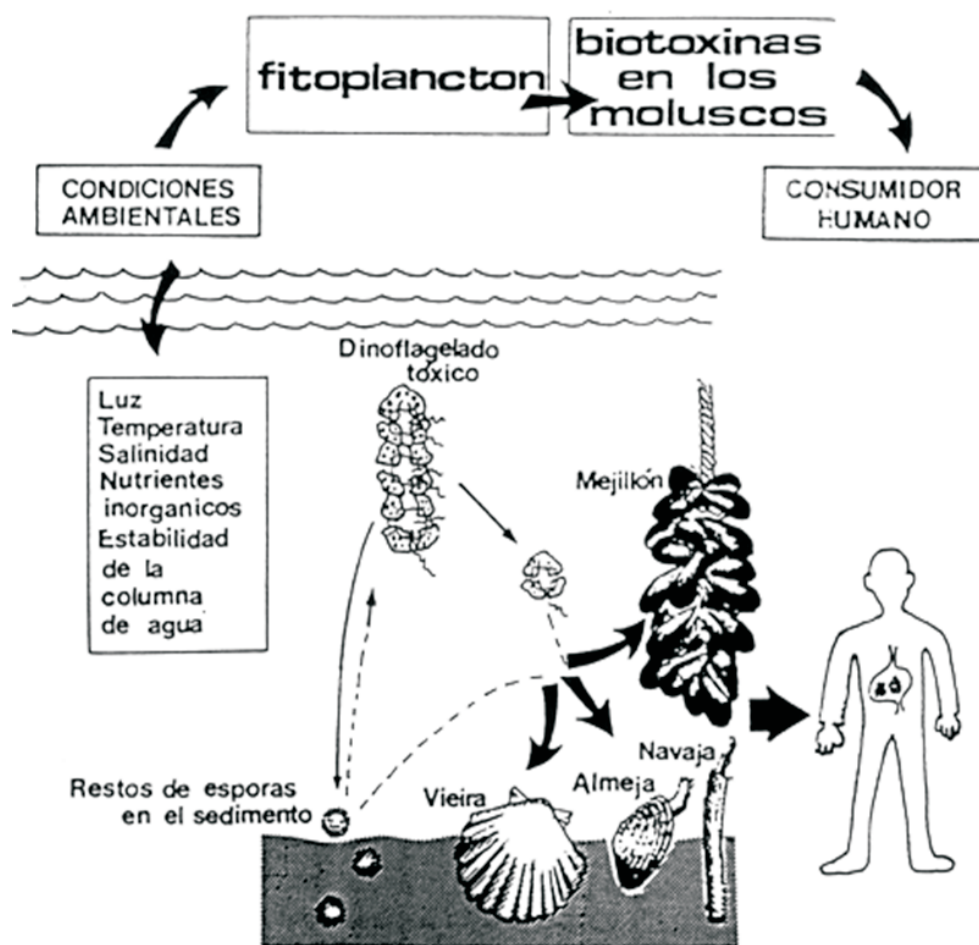


Figura 11. Intoxicación por consumo de bivalvos (Amengual, 1989).

El consumo de moluscos contaminados por toxinas de microalgas es uno de los problemas más serios para la industria de la acuicultura, causando grandes pérdidas económicas y graves problemas sanitarios (Bricelj & Shumway, 1998).

Afortunadamente, la mayoría de los países donde se explotan moluscos bivalvos han desarrollado programas de control para detectar toxinas, tanto en el medio marino como en los bivalvos, con el objetivo de garantizar la salubridad de los productos del mar para el consumo humano. Estos programas han re-

1. Introducción

ducido considerablemente los episodios de intoxicaciones en los últimos años (Andersen, 1996).

En Galicia, el centro encargado de llevar esta función es el INTECMAR (Instituto Tecnológico para el Control del Medio Marino de Galicia. Xunta de Galicia. Consellería do Medio Rural e do Mar).

Aun así, los efectos negativos originados por estos episodios han provocado una fuerte inversión de recursos para procurar eliminar o al menos disminuir en parte los problemas ocasionados por estas toxinas. La mayoría de los esfuerzos se han dirigido en procurar comprender los mecanismos de asimilación y acumulación de las toxinas, sus posibles transformaciones intracelulares y sus principales mecanismos de eliminación.

También se han intentado encontrar distintos métodos para disminuir la concentración de los compuestos tóxicos. Intentar controlarlos en el medio natural es muy complicado, ya que se trata de un fenómeno que ocurre de forma espontánea y es muy difícil poder modificar los factores de los que depende. La solución más efectiva, por el momento, es transferir los bivalvos a otras aguas libres de organismos tóxicos y con condiciones ambientales favorables para favorecer el proceso depurativo (Desbiens & Cembella, 1993). En algunas especies, como la vieira, se realiza un procesado industrial para reducir la concentración de toxina. Se basa en la eliminación de las partes que acumulan mayor cantidad de toxina, normalmente la glándula digestiva.

La capacidad de acumulación de toxinas por parte de los bivalvos varía tanto en el tipo de toxinas como en especies. Así, la vieira (*Pecten maximus*) retiene mayoritariamente el ácido domoico, tipo principal de la toxina amnésica o ASP, y presenta una escasa tasa de eliminación. Otros pectínidos, como *Aequipecten opercularis* (volandeira) o *Mimachlamys varia* (zamburiña), depuran estas toxinas con rapidez (Blanco, 2001). Por otra parte, los mejillones parecen ser insensibles a los efectos citotóxicos y secundarios del OA, lo que podría explicar por qué los mejillones acumulan altos niveles y, sin embargo, sobreviven durante largos periodos de exposición en el campo. En contraste, otras espe-

1. *Introducción*

cies, como ostras y berberechos, no acumulan este tipo de toxinas en el mismo grado. Esto podría sugerir que son más sensibles a los efectos nocivos de esta toxina (Svensson, 2003a).

Las moléculas de toxina se ligan químicamente a diversos tejidos y órganos de los bivalvos, sobre todo al hepatopáncreas, y tardan semanas o incluso meses en ser eliminadas. La velocidad de eliminación dependerá de diversos parámetros ambientales –el frío retarda la pérdida de la toxina o la disponibilidad de alimento favorece la depuración (Blanco *et al.*, 1999; Franco, 2006a)– y del lugar anatómico dónde esté almacenada: las del tracto gastrointestinal se eliminan más fácilmente que las presentes en otros tejidos (Franco, 2006a; FAO, 2004b).

Se han desarrollado numerosos estudios sobre el metabolismo de estas moléculas. Se han aplicado modelos para conocer los mecanismos de acumulación y eliminación de las toxinas. También se ha procurado predecir la duración de los episodios y su incidencia en la salud humana, además de buscar un mayor conocimiento de los diferentes tipos de toxinas. Actualmente, empiezan a ser conocidas estas rutas metabólicas y las dinámicas de los tóxicos en los distintos tejidos. Estos compuestos se eliminan directamente o sufren biotransformaciones, convirtiéndose en conjugados polares que serán más fácilmente excretados.

Los episodios tóxicos pueden estar provocados por una gran variedad de toxinas presentes en numerosas microalgas y con una amplia diversidad de efectos biológicos sobre el hombre. Dependiendo de las consecuencias ocasionadas por dichas toxinas y sus características, se pueden distinguir varios grupos (Escudeiro Rossignoli, 2012):

1.2.1. Toxinas responsables de intoxicaciones paralizantes (Paralytic Shellfish Poisoning-PSP)

Son producidas por un grupo de compuestos solubles en agua llamados colectivamente saxitoxinas (STX), que afectan al sistema nervioso central de mamí-

1. Introducción

feros. Las saxitoxinas son producidas por dinoflagelados de los géneros *Alexandrium*, *Gymnodinium* y *Pyrodinium*. En Galicia, las especies más frecuentes son *Alexandrium tamarensis* y *Gymnodinium catenatum* (Anderson *et al.*, 1989). Cuando las condiciones ambientales son adversas, los dinoflagelados tienen la capacidad de enquistarse y depositarse en el fondo marino, esperando a que en el medio se den factores que favorezcan su desarrollo produciéndose así grandes afloramientos.

Estas toxinas tienen gran afinidad por los canales de sodio inhibiendo la conductancia y bloqueando así la actividad neuronal en el sistema nervioso periférico. Los síntomas clínicos de PSP incluyen entumecimiento inicial de los labios y la cara. Se extiende a las extremidades con la consiguiente pérdida del control motor y, en casos extremos, ocasiona parálisis respiratoria y muerte. Los efectos que producen suelen ser reversibles si se trata al afectado.

1.2.2. Toxinas responsables de intoxicaciones amnésicas (*Amnesic Shellfish Poisoning-ASP*)

Están causadas por un neurotóxico soluble en agua conocido como ácido domoico (DA) (Wright *et al.*, 1989), producido por las diatomeas del género *Pseudo-nitzschia*, principalmente de *Pseudo-nitzschia pungens* (Subba Rao *et al.*, 1988). Se trata de un compuesto neuroexcitante que interfiere en los mecanismos de neurotransmisión, interrumpiendo la transmisión neuroquímica normal en el cerebro al fijarse a los receptores de glutamato, pudiendo provocar daños en las neuronas, incluso su muerte celular.

Los síntomas de la ASP incluyen efectos secundarios gastrointestinales con espasmos abdominales y vómitos, así como efectos neurológicos: mareos, letargo, convulsiones, desorientación y pérdida permanente de la memoria a corto plazo. Es una toxina nociva que puede provocar la muerte cuando se ingiere en dosis elevadas.

1. Introducción

1.2.3. Toxinas neurotóxicas (*Neurotoxic Shellfish Poisoning-NSP*)

Este tipo de intoxicación es causada por brevetoxinas, un grupo de compuestos de éter policíclicos con elevada neurotoxicidad y propiedades hemolíticas. La especie predominante es el dinoflagelado *Karenia brevis* (o *Gymnodinium breve*). Las brevetoxinas se unen a los canales de sodio dependientes de voltaje, inhibiendo los canales de activación y provocando prolongadas aperturas de los canales (Poli *et al.*, 1986).

Afectan al sistema nervioso central con los siguientes síntomas: náuseas, entumecimiento de la boca y la cara, pérdida del control motor con alteraciones de la visión, el habla o la ingestión. Los casos severos pueden producir pérdida del conocimiento.

1.2.4. Toxinas lipofílicas

Se subdividen en dos grupos, que se han agrupado conjuntamente, ya que para analizarlos, se extraen de los mejillones, usando los mismos procedimientos. Estructuralmente, no están relacionados entre sí.

1.2.4.1. Responsables de intoxicaciones diarreicas (DSP y AZP)

Debido a la amplia distribución geográfica, su frecuente presencia y los efectos que ocasionan, las toxinas diarreicas son uno de los grupos más importantes y más estudiados. En la Figura 12 (ver página siguiente) se puede ver los numerosos puntos en los que aparecieron casos de toxinas DSP durante el año 2008.

1.2.4.1.1. Toxinas responsables de intoxicaciones diarreicas (*Diarrhetic Shellfish Poisoning-DSP*)

DSP es producida por un compuesto poliéter, el ácido okadaico (OA) y sus derivados, las dinofisistoxinas (DTX), cuya estructura se ve en la Figura 13, de la página siguiente. Este grupo se describe con más detalle debido a su importancia en el estudio de esta tesis.

1. Introducción

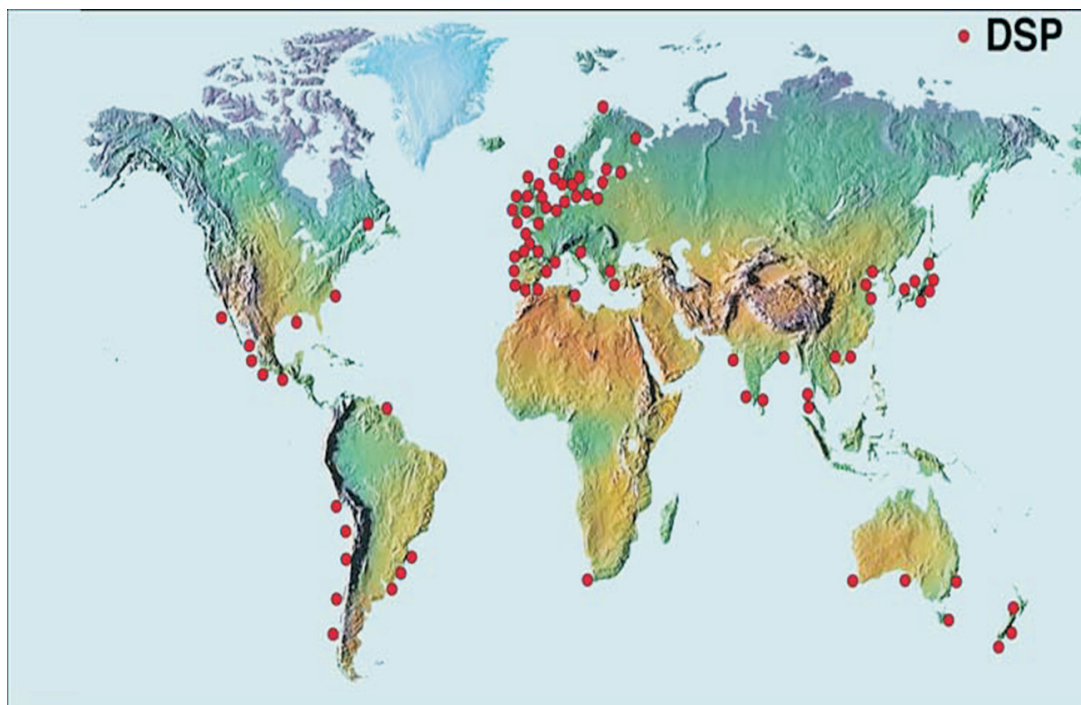
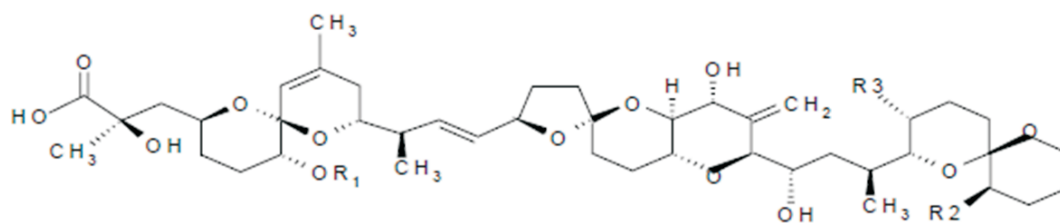


Figura 12. Distribución mundial de las toxinas DSP en 2008 (WHOI - Woods Hole Oceanographic Institution, 2008).

Se acumulan abundantemente en los moluscos filtradores, al ser sustancias lipofílicas. Su unión tiende a ser más favorable a las partes grasas, como los órganos del sistema digestivo (Murata *et al.*, 1982; Yasumoto *et al.*, 1985). La producen, sobre todo, dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* (*D. acuta*, *D. fortii*, *D. acuminata*, *D. norvegica*, *D. mitra*, *D. rotundata* y *D. caudata*,) y *Prorocentrum* (*P.*



Ácido okadaico (OA)
 Dinofisitoxina - 1 (DTX1)
 Dinofisitoxina - 2 (DTX2)
 Dinofisitoxina - 3 (DTX3)

R1	R2	R3
H	H	CH ₃
H	CH ₃	CH ₃
H	CH ₃	H
acyl	CH ₃	CH ₃

Figura 13. Estructura de toxinas DSP, ácido okadaico (OA) y derivados (FAO, 2004b).

1. Introducción

lima) (Yasumoto *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1989; Hallegraeff, 1993), capaces de sintetizar ácido okadaico y algunos de sus derivados. En Galicia las especie responsables de los abundantes episodios tóxicos de DSP varían de unas rías a otras, aunque están asociados especialmente a la especie *Dinophysis acuminata* (Blanco *et al.*, 2005).

Este grupo de toxinas provocan una inhibición de las proteínas fosfatasa que degradan los fosfatos de las proteínas de las células del epitelio intestinal, lo que genera la salida de agua hacia el exterior, produciendo trastornos digestivos, especialmente náuseas, vómitos, diarrea y dolores abdominales. Los principales síntomas aparecen entre 30 minutos y unas 7 horas después del consumo. Los pacientes se recuperan en un máximo de tres o cuatro días, sin dejar secuelas.

A pesar de la descripción de unas intoxicaciones previas con síntomas característicos a los producidos por estas toxinas, no es hasta el año 1976 cuando se documenta por primera vez este fenómeno en Japón, donde varias personas resultaron afectadas, presentando problemas gástricos tras el consumo de bivalvos (Hallegraeff, 1993).

Entre Yasumoto *et al.*, en 1978 y Murata *et al.*, en 1982, localizaron, aislaron e identificaron los agentes causantes de esta intoxicación. La principal toxina responsable fue identificada como ácido okadaico (OA), implicada en las intoxicaciones de tipo diarreico (DSP). En 1980, Yasumoto *et al.* consiguieron relacionar esta molécula con uno de los organismos productores, el dinoflagelado planctónico *Dinophysis fortii*.

Tras estos descubrimientos, se empezó a relacionar la aparición de los cuadros clínicos previamente descritos con una serie de episodios causados por toxinas DSP alrededor de todo el mundo y se empezó a llevar un control de la aparición de casos. Entre 1976 y 1982 unos 1300 casos por intoxicación de DSP se documentaron en Japón. En 1981 se produjeron más de 5000 en España y en 1983 alrededor de 3300 en Francia (Hallegraeff, 1993).

1. Introducción

El OA ha sido descrita como la toxina principal de las DSP (Murata *et al.*, 1982), mientras que los DTX son isómeros o derivados del ácido okadaico. DTX-1 se detectó por primera vez en Japón, en la especie *Dinophysis fortii*. Fue aislada y descrita por Murata *et al.* (1982). DTX-2 se descubrió en mejillones irlandeses durante un episodio de DSP, localizados por los programas de monitoreo por primera vez en 1991 (Carmody *et al.*, 1995).

Con el tiempo, se hallaron nuevos derivados y se determinó que procedían de las toxinas progenitoras, es decir, del AO, la DTX-1 y la DTX-2, que podían estar aciladas con una serie de ácidos grasos, saturados e insaturados, fundamentalmente con C14 y C18 (Hallegraeff *et al.*, 1995; Wright, 1995). Yasumoto *et al.*, en 1985, describe la DTX-3. Este derivado nunca se había localizado en microalgas marinas, por lo que se creía que eran productos de biotransformación de los bivalvos, originados mediante acilación (Lee *et al.*, 1989). Sin embargo, MacKenzie *et al.*, en 2002, detectaron DTX-3 en proporciones similares, tanto en *Dinophysis acuta* como en los mejillones *Perna canaliculus* de Nueva Zelanda, sugiriendo que esta toxina también podía ser asimilada por el mejillón a través de la alimentación.

Con el desarrollo de nuevas técnicas de detección, Hu *et al.* (1995 a y b) encontraron nuevos derivados del OA en el dinoflagelado bentónico *Prorocentrum lima*, el DTX-4 y DTX-5 más polares que las toxinas originales y solubles en agua. Por último, recientemente, en una revisión realizada por Blanco *et al.* (2005) se hace referencia a otra dinofisitoxina, la DTX-6, también producida por el género *Prorocentrum*.

Desde el punto de vista de la salud pública, en algunos países, la vigilancia de las aguas para la detección de algas peligrosas y el control periódico de muestras de individuos potencialmente contaminados permite minimizar los problemas causados por la aparición espontánea de toxinas en el medio. El diseño de los programas de monitoreo están basados en el hecho de que los eventos tóxicos pueden tener lugar en cualquier periodo del año y los niveles de toxicidad pueden afectar solo a pequeñas áreas.

1. Introducción

Para ello, se han dividido las zonas de producción en otras más pequeñas y se realizan controles, diferenciando las distintas especies que se explotan, debido a sus dinámicas de intoxicación-detoxificación y períodos de recolección. El conocimiento del desarrollo de los episodios tóxicos, así como el uso de métodos de análisis con el fin de conocer la concentración de toxinas en las distintas especies, han ayudado en los últimos años a tener un control sobre las intoxicaciones en la población.

En Galicia esta función es llevada a cabo por el INTECMAR. En este centro se hacen mediciones periódicas de la concentración de microalgas en el medio, determinando las distintas especies que se pueden localizar. Además, se recogen muestras de los diferentes moluscos que se explotan para medir la concentración de sustancias tóxicas que pudieran haber asimilado.

La prueba usada más universal es el bioensayo del ratón, que se basa en la extracción de las toxinas del marisco y la administración del extracto de la muestra por vía intraperitoneal, controlando los síntomas y los tiempos de muerte. De esta forma, la dosis mínima de OA requerida para producir síntomas en humanos adultos se define como la cantidad de toxina requerida para provocar la muerte de un ratón de 20 g en 24 horas (Yasumoto *et al.*, 1978).

Durante muchos años, se ha considerado el método más útil como prueba legalmente admisible para la suspensión de la captura. Recientemente, los análisis químicos han adquirido una gran aceptación, porque son más rápidos y más exactos. Hasta el año 2014, el bioensayo en ratón (Yasumoto *et al.*, 1978) va a continuar siendo uno de los métodos oficiales para detectar el OA y las DTX.

A partir de entonces, los análisis por métodos químicos basados en la separación de las toxinas por cromatografía líquida de alta eficacia y detección colorimétrica, fluorimétrica o por espectrometría de masas, así como la electroforesis capilar, se impondrán como métodos oficiales de detección de las toxinas (Comisión Europea, 2011).

1. Introducción

1.2.4.1.2. Azaspirácido (*Azaspiracid Poisoning-AZP*)

Descubierto recientemente en mejillones procedentes de Irlanda, Reino Unido y Noruega, producen una intoxicación gastrointestinal en humanos con síntomas como náuseas, vómitos, diarrea y calambres de estómago (James *et al.*, 2002). Hasta hace poco se consideraba al dinoflagelado *Protoperidinium crassipes* el causante de esta intoxicación, pero recientemente se ha descubierto que solo actúa como vector y la toxina es producida por otra especie, *Azadinium spinosum* (Tillmann *et al.*, 2009). La AZA es la principal toxina del grupo, pero hay al menos otros once análogos (AZA1-AZA11) (Díaz *et al.*, 2004). Se caracterizan por presentar una única estructura que incluye un anillo de unión azaspiro, una amina cíclica y un ácido carboxílico.

1.2.4.2. Intoxicaciones no diarreogénicas (PTX, YTX, SPX)

1.2.4.2.1. *Pectenotoxinas* (PTX)

Son lactonas poliéter de las que se han conseguido aislar y caracterizar quince compuestos análogos distintos. Las toxinas del grupo de las PTX son estables en el calor, pero se destruyen fácilmente en condiciones básicas fuertes y son también lábiles en condiciones de acidez. Según estudios realizados en ratones, producen daños en la zona intestinal y son originadas por determinados dinoflagelados, exclusivamente por varias especies del género *Dinophysis*, frecuentemente productoras a su vez de toxinas diarreicas (FAO, 2004b; Blanco *et al.*, 2007a; Miles, 2007).

1.2.4.2.2. *Yesotoxinas* (YTX)

No causan intoxicaciones importantes en humanos. Sin embargo, interfieren en la detección de otras toxinas y dan lugar a falsos positivos, lo que supone un grave problema económico. Provocan efectos cardiotóxicos y citotóxicos. Es producida principalmente por los dinoflagelados *Protoceratium reticulatum* y *Lingulodinium polyedrum* (Paz *et al.*, 2004). Además de la YTX, se han descrito numerosos análogos, algunos de ellos producidos directamente por los dinoflagelados y otros, producto del metabolismo de los moluscos.

1. Introducción

1.2.4.2.3. *Espirólidos (SPX)*

Son toxinas de acción rápida, ya que producen la muerte en ratones tras inyección intraperitoneal. Los síntomas incluyen piloerección, espasmos musculares y abdominales, hiperextensión del lomo y arqueado de la cola. Su principal productor es el dinoflagelado *Alexandrium ostenfeldii* (Cembella *et al.*, 1998). Fueron aisladas y caracterizadas por primera vez en un extracto lipofílico de vieiras y vísceras de mejillones recolectados en Nueva Escocia, Canadá.

1.2.5. *Ciguatera (Ciguatera Fish Poisoning-CFP)*

Las toxinas implicadas son ciguatoxinas (CTX) solubles en grasas y maitotoxinas (MTXs) solubles en agua. Se trata de una intoxicación causada por compuestos producidos por ciertos dinoflagelados que viven en detritus y macroalgas asociadas a sistemas de arrecifes, principalmente por *Gambierdiscus toxicus* (Besada *et al.*, 1982).

Los vectores de la intoxicación son peces semipelágicos de arrecifes coralinos que van acumulando estos compuestos por estar en lo alto de la cadena alimentaria marina. Son responsables de una intoxicación humana muy importante, que produce numerosos problemas neurológicos, cardiovasculares y trastornos gastrointestinales, que provocan cefaleas, mareos, vómitos, diarreas, bradicardia y arritmias. Actúan sobre los canales de sodio, abundantes en las células nerviosas y modifican sus propiedades eléctricas (FAO, 2004b).

1.2.6. *Palitoxina*

Es neurotoxina muy potente de carácter no proteico. Producida por corales del género *Palythoa* y por el dinoflagelado bentónico *Ostreopsis* (Taniyama *et al.*, 2003), en general se introduce en la cadena alimentaria a través del consumo de cangrejos, algún pez o invertebrado marino. Existen numerosos análogos estructurales e isómeros, debido a su tamaño y características conformacionales.

1. *Introducción*

Actúa a nivel de la bomba sodio/potasio, inhibiendo el funcionamiento de la ATPasa y creando un canal permanentemente abierto a través del cual los iones fluyen a favor de gradiente (Artigas & Gadsby, 2003). La intoxicación provoca náuseas, hipersalivación, calambres abdominales, diarrea severa, parestesia de las extremidades, calambres musculares y dificultad respiratoria. En casos severos, la muerte se produce entre los 30 minutos y hasta cuatro días tras su consumo (Onuma *et al.*, 1999).

En las rías gallegas, las biotoxinas más frecuentes son: PSP, DSP y ASP, por lo que actualmente son las que están reglamentadas y a las que se les realiza un seguimiento y un control periódico. Los dos primeros grupos son moléculas lipofílicas y, por ahora, se determinan mediante ensayos biológicos, aunque la Unión Europea aprobó hace dos años un nuevo reglamento, en el que se establecía un período máximo de tres años para sustituir completamente los bioensayos por análisis químicos como métodos oficiales de detección de las toxinas (Comisión Europea, 2011). Para la determinación de las toxinas amnésicas, se usa la cromatografía líquida de alta eficacia.

1.3. Resistencia frente a xenobióticos

1.3.1. Captación

El medio marino constituye el destino final de la mayor parte de contaminantes, por lo que las concentraciones de tóxicos son especialmente elevadas. Los organismos ligados a este medio están expuestos de forma masiva y crónica a un amplio abanico de sustancias, muchas veces nocivas. El mejillón es una especie que filtra grandes volúmenes de agua para alimentarse, acumulando y concentrando una amplia variedad de contaminantes orgánicos y toxinas.

El grado con el que los tóxicos son retenidos depende de la concentración y las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, tal como solubilidad, hidrofobicidad, o si son partículas libres o que forman complejos. También obedece a factores bióticos como la fase reproductiva en la que se encuentra el indi-

1. Introducción

viduo o su actividad fisiológica y metabólica, muchas veces dependientes de los factores ambientales (Widdows & Donkin, 1992).

Esta captación se lleva a cabo de diferentes modos: puede ser a través de las membranas de las branquias; en la alimentación, siendo asimilados mediante el sistema digestivo; o una entrada directa por contacto con la superficie del manto. Los factores que determinan el porcentaje de absorción de toxinas están relacionados con la fisiología nutritiva y la cantidad de dinoflagelados productores de toxinas que haya en el medio (Blanco *et al.*, 1999; Moroño *et al.*, 2003).

Respecto al OA y otras toxinas, el contenido presente en cada microalga puede variar considerablemente, dependiendo de la especie y las condiciones del momento, siendo esto otro factor a tener en cuenta en las concentraciones de toxina captada (Lee *et al.*, 1989; Andersen *et al.*, 1996).

1.3.2. Difusión y almacenamiento

Una vez que las toxinas llegan al tejido, la composición bioquímica y las condiciones fisiológicas del mejillón, afectarán a la distribución y el destino del tóxico (Widdows & Donkin, 1992). La acumulación de una sustancia depende de varios factores: las propiedades físico-químicas de la molécula; el transporte activo y difusión a través de las membranas celulares; la tasa de metabolización y acumulación de los metabolitos, la especificidad de los órganos y tejidos, así como las cinéticas de entrada y depuración.

Los compuestos lipofílicos, como el OA y sus derivados, tienen tendencia a unirse a las zonas grasas, por lo que habrá una mayor asimilación dependiendo de la concentración de lípidos que existan en ese momento en el organismo y en los distintos tejidos. Esto está relacionado con varios factores, como el período reproductivo en que se encuentre (habrá un mayor almacén de reservas de grasas en la época previa a la puesta), o la actividad metabólica, muchas veces dependiente de los factores ambientales (De Zwaan & Mathieu, 1992).

1. Introducción

Por tanto, la correlación entre el contenido lipídico en el organismo y la concentración de toxina podría explicar la amplia variabilidad de concentración de OA que existe entre individuos y las diferencias de acumulación que se producen según la estación anual.

El transporte de los contaminantes orgánicos a través de las membranas celulares puede ser por difusión pasiva (las moléculas pasan a favor del gradiente de concentración y sin consumo de energía), transporte activo (transporte de moléculas, incluso en contra de un gradiente de concentración con gasto energético) o por endocitosis, mediante vesículas formadas por una invaginación de la membrana. Los tóxicos absorbidos tienen tendencia a difundirse a través del organismo y se propagan por los diferentes compartimentos, pasando por medio del sistema circulatorio a otros tejidos, atravesando las membranas celulares. Los xenobióticos de pequeña talla, moléculas no cargadas eléctricamente, son capaces de atravesar la bicapa lipídica y pasar a través de las membranas celulares. Las moléculas lipófilas o de gran tamaño entran en la célula mediante las lipoproteínas a las que se ligan. También pueden ser capturadas por la célula mediante el fenómeno de endocitosis, especialmente en los hepatocitos (Moore & Willows, 1998).

Determinados contaminantes hidrófobos tienen tendencia a acumularse en los tejidos o compartimentos ricos en lípidos, como en adipocitos, membranas y lipoproteínas. Además de unirse a estos componentes de los tejidos, los tóxicos presentan otras zonas de afinidad, que son los lisosomas. Las células de la glándula digestiva son muy ricas en lisosomas (Moore, 1990) y el almacenamiento que llevan a cabo representan un importante mecanismo de protección frente a diversos compuestos (Moore & Willows, 1998).

La acumulación y eliminación de DSP en los distintos órganos y tejidos se produce a diferentes ritmos, en base a las diferentes afinidades que existan entre ellos. Sin embargo, se ha observado que la distribución anatómica de estos compuestos parece concentrarse en la glándula digestiva del mejillón. Se han realizado análisis de los tejidos no viscerales que lo confirman, encontrando solo trazas de OA y sus derivados (Blanco *et al.*, 2007b).

1. Introducción

Otro estudio en la vieira *Patinopecten yessoensis* mostraba la acumulación de varias toxinas en el hepatopáncreas tras la inyección de estas en el músculo aductor, acompañadas de pequeñas transformaciones de los metabolitos (Suzuki *et al.*, 2005). Por tanto, parece ser que la mayor parte de este tipo de toxinas son finalmente transportadas y acumuladas en la glándula digestiva, donde serán transformadas y expulsadas del organismo.

La asimilación constante de tóxicos en los tejidos de algunos animales se va amplificando exponencialmente a medida que subimos en los niveles de la cadena alimentaria. Esto puede conllevar efectos perjudiciales, debido a las concentraciones que se pueden llegar a alcanzar, aunque, por lo general, los contaminantes finalmente almacenados suelen ser poco reactivos. De todas formas, algunos de los tóxicos pueden constituir un riesgo para el ecosistema, en la medida en que se produzca algún tipo de consecuencia debido a la bioamplificación, provocando los efectos tóxicos en los organismos predadores (Franke *et al.*, 1994).

1.3.3. Respuesta y depuración del organismo frente la presencia de xenobióticos

Las rutas de desintoxicación incluyen la eliminación directa a través de las branquias, la expulsión mediante el sistema digestivo y, en algunos casos, los compuestos lipofílicos pueden ser eliminados mediante la puesta. La depuración es un proceso donde la cantidad de eliminación de contaminantes se ve afectada por factores como el período estacional o la temperatura. También influirá la duración a la exposición al contaminante, ya que tiempos cortos conllevan una eliminación rápida y completa, mientras que frente a exposiciones más prolongadas la expulsión es más lenta y a menudo incompleta (Livingstone & Pipe, 1992).

La presencia de contaminantes en el organismo constituye un estrés que induce ciertas modificaciones a nivel fisiológico y metabólico. Esta respuesta está constituida por mecanismos celulares que reducen los efectos tóxicos, mediante una modificación del metabolismo que facilita la excreción de toxinas.

1. Introducción

1.3.3.1. Proteínas de estrés

Existen varios grupos de proteínas que se activan durante la exposición a contaminantes, actuando sobre la detoxificación y la reparación de compuestos celulares dañados. Son conocidas como proteínas de estrés. Entre ellas se encuentran las proteínas de choque térmico o HSP (*Heat Shock Proteins*), que están presentes en todas las células y son codificadas por genes que se activan en situaciones de estrés, afectando a la estructura y función de las proteínas celulares. Actúan como chaperonas moleculares y tienen un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis, ya que ayudan al plegamiento y ensamblaje de otras proteínas con cambios en la conformación tridimensional (Feder & Hofman, 1999). Confieren a las células resistencia, reparando y protegiendo a las proteínas de daños ocasionados por los tóxicos.

Otros grupos de proteínas que entran en acción en estas situaciones son las GRP (*Glucose Regulated Proteins*), las ubiquitinas y las proteasas. Todas estas proteínas de estrés se distinguen según la especificidad de sustratos a los que se unen y las distintas funciones que llevan a cabo en la célula. Además, presentan gran conservación en los distintos grupos filogenéticos, lo que sugiere un papel fundamental para el funcionamiento celular.

Existe otro conjunto de moléculas, las metalotioneinas (MT), ricas en cisteínas y que actúan cuando el organismo se expone a la presencia de metales. Presentan un papel fundamental en la fijación de metales esenciales en la célula, controlando las concentraciones de las formas libres y su destino en la célula, así como en la detoxificación de metales no esenciales y el control de los efectos tóxicos que pueden conllevar (Kägi & Schäffer, 1988).

Un mecanismo fundamental que se activa frente a la presencia de toxinas o contaminantes antropogénicos son los sistemas de multirresistencia frente a xenobióticos (MXR). Estos permiten a los organismos presentar una resistencia a los efectos tóxicos de una gran variedad de moléculas, gracias a un bombeo activo al exterior de la célula, que reduce la acumulación intracelular de contaminantes (Kurelec, 1995a; Bard, 2000).

1. Introducción

Este sistema se considera un fenómeno análogo a la multirresistencia frente a fármacos o multidrug resistance (MDR) descrita y demostrada en líneas de células tumorales resistentes a tratamientos químicos (Endicott & Ling, 1989; Kurelec, 1992). Este mecanismo favorece la disminución de los xenobióticos acumulados intracelularmente por la activación de determinadas proteínas transportadoras de membrana de la superfamilia de proteínas ABC, particularmente a la P-glicoproteína (P-gp o MDR), las proteínas de multirresistencia frente a fármacos (*Multidrug Resistance Proteins* - MRP) y la *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP) (Bard, 2000; Pain & Parant, 2003a; Choudhuri & Klaassen, 2006), cuya estructura se ve en la Figura 14 (Leslie *et al.*, 2005).

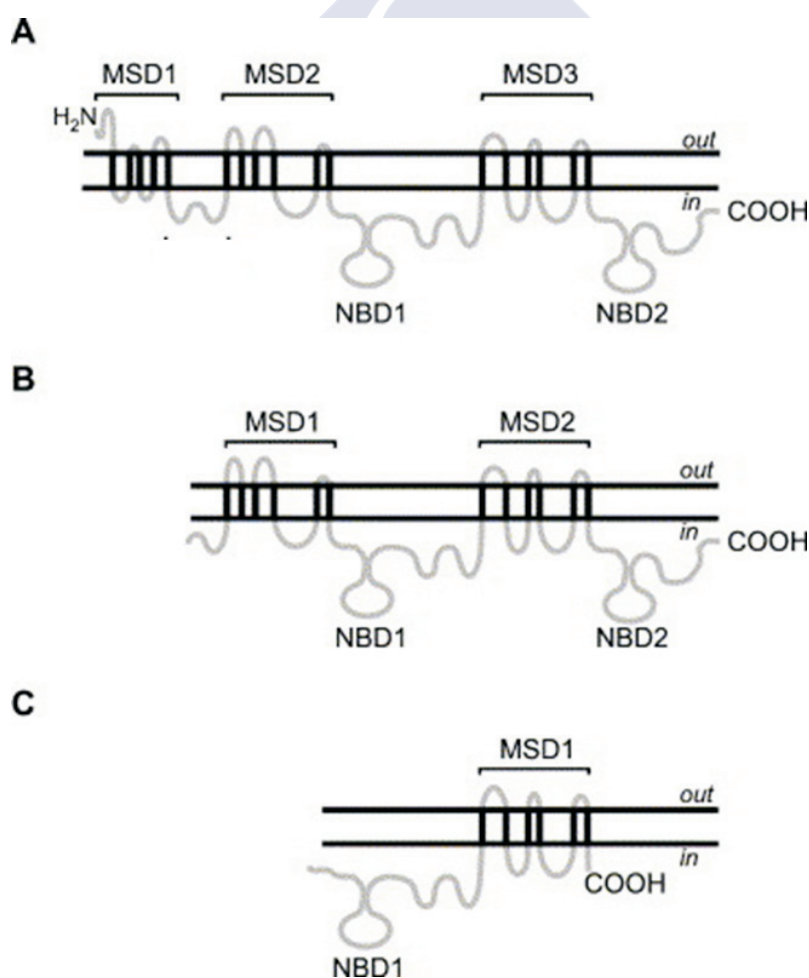


Figura 14: Modelos topológicos de las estructuras secundarias, de los transportadores ABC más estudiados. a) Corresponde a la estructura de las MRPs; b) Estructura de la MDR o P-glicoproteína; c) Morfología de la proteína BCRP o ABCG2. El MSD (*membran spanning domain*) corresponde con los dominios transmembrana (TMB) y los NBD (*nucleotid binding domain*), con los dominios de unión al ATP (Leslie *et al.*, 2005).

1. Introducción

Estas proteínas transmembrana funcionan dependientes del ATP, bombeando determinados compuestos al exterior y reduciendo los niveles intracelulares contra gradiente de concentración.

Este sistema constituye una primera línea de defensa en organismos acuáticos y, probablemente, tenga un importante papel en la eliminación de toxinas durante los procesos de detoxificación en moluscos, asociados a episodios tóxicos de ficotoxinas lipofílicas, como el caso del OA y sus complejos derivados. La estructura molecular de estos compuestos se ajusta perfectamente a los metabolitos que se pueden unir y ser expulsados por las proteínas transportadoras de membrana.

Los MXR son capaces de transportar al exterior de la célula una gran variedad de compuestos químicos, tanto naturales como de origen antropogénico, con una serie de características comunes, como una cierta hidrofobicidad, anfipáticos, de bajo peso molecular y una configuración espacial plana (Bard, 2000).

Esta baja especificidad por los sustratos sugiere que es un mecanismo general de defensa frente a la presencia de distintos contaminantes, con un papel protector a la exposición de toxinas y xenobióticos presentes en el medio (Epel, 1998).

Este sistema funciona de forma prácticamente universal, desde arqueobacterias hasta mamíferos (Leslie *et al.*, 2005). La inducción de la actividad MXR en presencia de contaminantes en organismos acuáticos, y en concreto en bivalvos, ha sido estudiada por numerosos investigadores.

Se ha confirmado la actividad de las proteínas MDR como una primera línea de defensa frente a tóxicos ambientales (Toomey & Epel, 1993; Waldman *et al.*, 1995; Galgani *et al.*, 1996; Schröder, 1998; McFadzen, 2000; Kingtong, 2007; Manfrin, 2010), contaminantes antropogénicos (Cornwall *et al.*, 1995; Kurelec, 1995b; Parant & Pain, 2001; Pain, 2003a; Kingtong, 2007), metales pesados (Bard, 2000; Achard *et al.*, 2004; Franzellitti & Fabbri, 2006; Ivanina & Sokolova, 2008) o activados por diferentes factores medioambientales (Epel,

1. Introducción

1998; Eufemia & Epel, 2000; Parant & Pain, 2001; Pain & Parant, 2003b; Luedeking & Koehler, 2004; Tutundjian & Minier, 2007; Manfrin, 2010).

La actividad y presencia de estas proteínas en los organismos se ha demostrado con el uso de diferentes técnicas. Una de las más empleadas para medir la actividad es el uso de marcadores fluorescentes, como la rodamina. Fue empleada por primera vez por Neyfakh en 1988, y está basada en la expulsión de ciertos marcadores por estas proteínas, pero, bajo la presencia de otros sustratos inhibidores del transportador, el marcador se acumula en el interior de la célula, pudiendo ser cuantificada por la fluorescencia que emite.

Numerosos investigadores han usado esta técnica para confirmar la actividad de las proteínas de resistencia en moluscos (Cornwall *et al.*, 1995; Kurelec, 1995 a y b; Galgani *et al.*, 1996; Minier & Moore, 1996a; Epel, 1998; Eufemia & Epel, 2000; Bard, 2000; McFadzen, 2000; Parant & Pain, 2001; Minier *et al.*, 2002; Pain & Parant 2003b; Zaja *et al.*, 2006; Tutundjian & Minier, 2007; Ivanina & Sokolova, 2008).

Otro método usado muy a menudo es la detección inmunoquímica usando anticuerpos monoclonales específicos, que fue desarrollada por Georges *et al.*, en 1990. El C219 es un anticuerpo que reacciona con la P-gp, ya que está dirigido a una región aminoacídica altamente conservada, presente en proteínas transportadoras de multidrogas.

Esta técnica presenta un problema potencial, ya que puede generar falsos positivos por la unión con otras proteínas que presenten regiones similares a las que se puedan acoplar. Aún así, se ha empleado en numerosos estudios en bivalvos con resultados satisfactorios: en la almeja *Corbicula fluminea* (Waldmann *et al.*, 1995; Achard *et al.*, 2004); en ostras *Crassostrea virginica* (Keppler & Ringwood, 2001, Ivanina & Sokolova, 2008) y *C. gigas* (Minier *et al.*, 2002) y en mejillones *Mytilus californianus*, *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *Perna perna* (Cornwall *et al.*, 1995; Galgani *et al.*, 1996; Minier & Moore, 1996a; Epel, 1998; Eufemia & Epel, 2000).

1. Introducción

En los últimos años, el uso de técnicas moleculares ha ayudado a confirmar la presencia de estos grupos de proteínas en numerosos moluscos y su actividad frente a distintos compuestos perjudiciales para los organismos. La expresión de la P-glucoproteína se ha observado en distintos bivalvos y en algunos de ellos ya se han clonado y caracterizado las secuencias nucleotídicas que codifican estas (Minier *et al.*, 2002; Smital *et al.*, 2003; Achard *et al.*, 2004; Luedeking *et al.*, 2005; Franzellitti & Fabbri, 2006; Tutundjian & Minier, 2007; Luckenbach & Epel, 2008; Ivanina & Sokolova, 2008; Manfrin, 2010).

1.3.3.2. Mecanismos de metabolización

Aunque la actuación de las proteínas de desintoxicación es permanente, los xenobióticos suelen acumularse en el organismo, con la consecuente aparición de efectos tóxicos para los individuos. Entonces, entran en funcionamiento mecanismos celulares para reducir estos efectos y facilitar la excreción de los contaminantes y de los productos reactivos que se generan.

La mayoría de los tóxicos captados son de naturaleza hidrófoba y, tras el proceso de metabolización, se transforman en productos más hidrófilos, con el fin de que puedan ser transportados más fácilmente, a través del sistema circulatorio, a los tejidos excretores.

La transformación y eliminación de los compuestos tóxicos tiene lugar en varias fases en las que participan una serie de sistemas enzimáticos. Primero se produce una metabolización de los productos; le sigue una conjugación de los derivados metabólicos, para una posterior excreción. Estos mecanismos permiten facilitar la eliminación de los contaminantes y proteger a los organismos de sus efectos nocivos, aunque en algunos casos pueden formarse moléculas particularmente reactivas que presentan una toxicidad más elevada que la molécula original.

Fase I

Tiene lugar la transformación de los xenobióticos lipófilos asociado al citocromo P450, que son sistemas enzimáticos donde se llevan a cabo las reacciones

1. Introducción

de metabolización (Figura 15). Se produce una biotransformación que provoca la conversión de compuestos lipofílicos (no polares) en compuestos más polares y, por lo tanto, algo más solubles en agua. Actúan oxidorreductasas e hidrolasas que catalizan reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, originándose derivados metabólicos más polares que pueden ser excretados directamente. También se forman compuestos derivados más hidrosolubles y que son frecuentemente más reactivos, lo que suele conllevar mayor capacidad tóxica. Estos metabolitos que se crean, generalmente, serán sustratos de las enzimas de la Fase II.

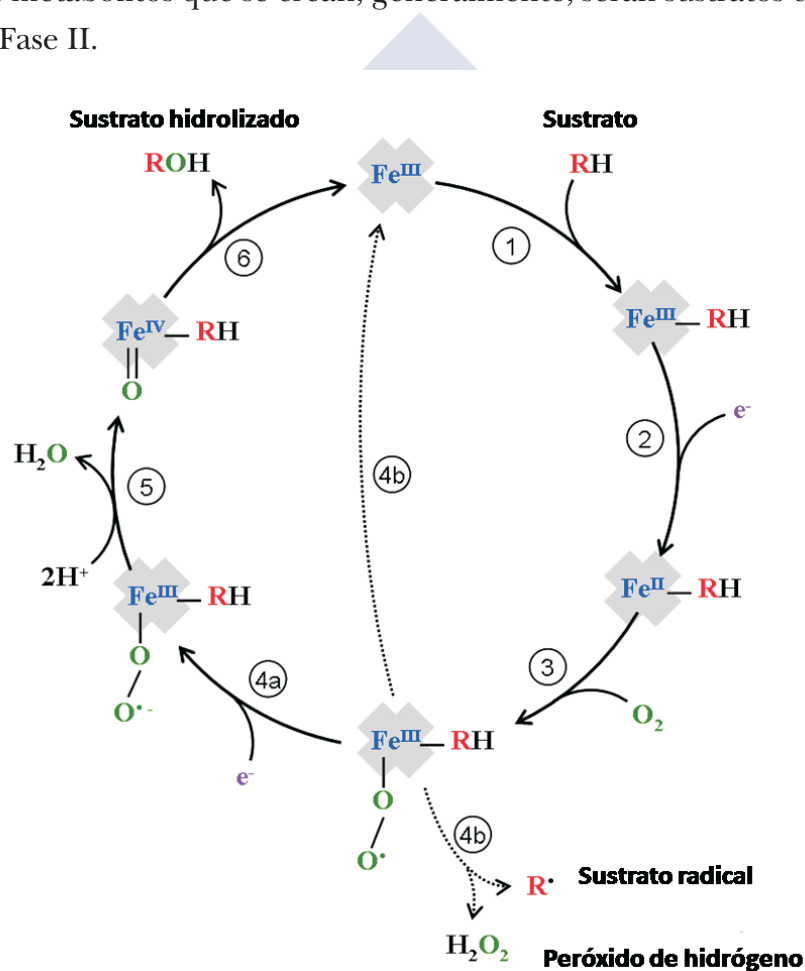


Figura 15: Mecanismo de acción del citocromo P450. El sustrato (R) se une al Fe^{III} (1) que después se reduce con una transferencia de electrones (2) catalizada por el NADPH reductasa del citocromo P450. En el siguiente paso, una molécula de oxígeno se fija (3), entonces, un segundo electrón se transfiere (4a) formando así una peroxicomplejo, y a continuación el puente O-O se corta (5). El radical hidroxilo es finalmente liberado (6) y apoyado por otros mecanismos, mientras que el citocromo está listo para un ciclo de reacción nuevo. A veces el ciclo es incompleto y el sustrato se libera como radical con peróxido de hidrógeno después de la fijación de oxígeno (4b), ambos productos tienen un alto potencial de oxidación y puede generar daño oxidativo en los componentes celulares. (modificado a partir de Manduzio, 2004).

1. Introducción

Fase II

Las transferasas, enzimas usadas en esta fase, catalizan reacciones de conjugación de las moléculas tóxicas con diferentes metabolitos aceptores, donde los xenobióticos polares son unidos con sustancias endógenas hidrofílicas, como el ácido glucurónico, sulfatos o el glutatión (Kurelec *et al.*, 1986; James, 1987). Estas reacciones enzimáticas tienen como objetivo aumentar aún más la hidrosolubilidad de los sustratos para que sean más fáciles de eliminar por el organismo, generalmente por las proteínas MRP. Además, la mayor parte de los metabolitos originados presentan menor toxicidad y baja actividad biológica, por lo que muchas reacciones de esta fase se podrían considerar reacciones de bioinactivación, aunque no siempre.

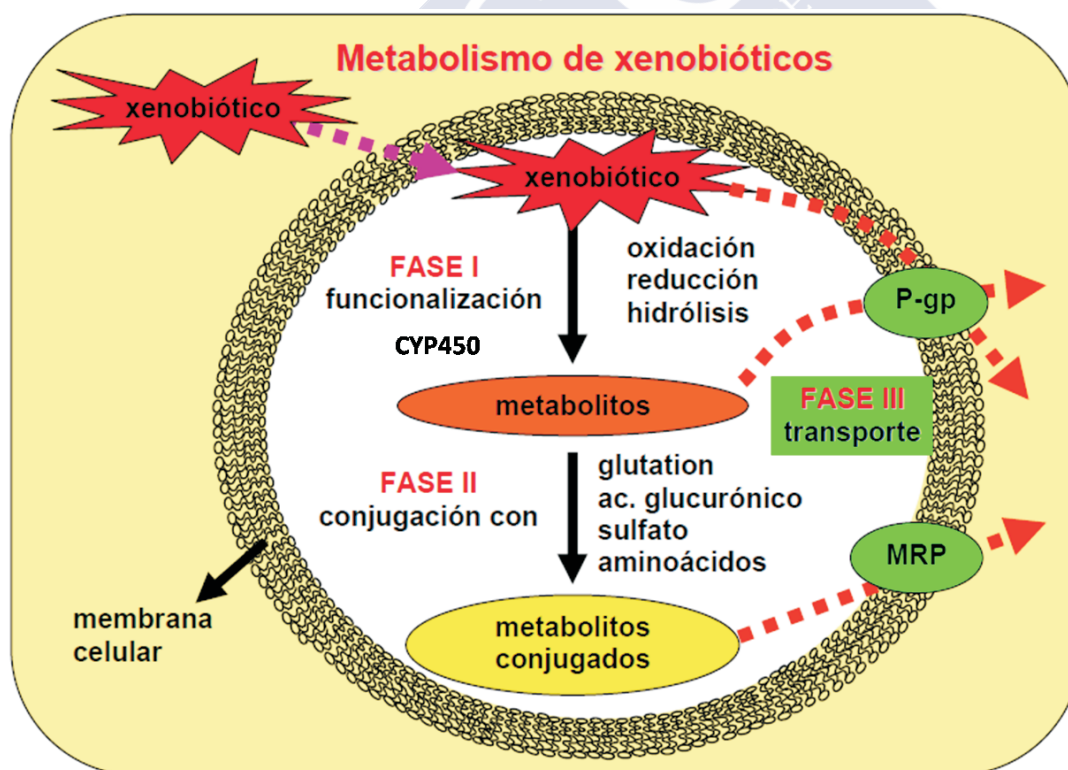


Figura 16: Modelo del proceso de desintoxicación de xenobióticos. Un tóxico puede ser eliminado de forma directa a través de transportadores ABC (P-gp). A altas concentraciones, el tóxico se acumula, y es metabolizado por enzimas de la familia Citocromo P450. Los metabolitos resultantes pueden eliminarse directamente a través de la P-gp; o conjugarse con el glutatión, ácido glucurónico, sulfato o aminoácidos, para ser expulsados por transporte activo de la MRP.

1. Introducción

Fase III

Los derivados metabólicos conjugados son excretados por bombeo, mediante una serie de transportadores de membrana dependientes de ATP, el sistema MXR, constituido por las proteínas transportadoras de membrana. Estas proteínas pueden catalizar el transporte de una estrecha variedad de aniones hidrofóbicos, ayudando a eliminar productos de la fase II hacia el medio extracelular. Estos transportadores también pueden actuar como una primera línea de defensa, conocida como Fase 0, controlando la acumulación intracelular de toxinas gracias a una excreción directa de xenobióticos.

Se puede observar un esquema de cómo funciona este mecanismo en la Figura 16 (Bard, 2000; Luedeking & Koehler, 2004).

1.4. Proteínas ABC

Como ya se ha comentado, la P-glucoproteína (MDR1 o ABCB1) es un transportador de membrana, perteneciente a la subfamilia de las proteínas ABCB (Leslie *et al.*, 2005), que actúa como una bomba dependiente de energía enviando moléculas tóxicas al exterior de las células (Bard, 2000).

Este grupo de proteínas transportadoras pertenecen a la superfamilia de las ABC (*ATP-Binding Cassette*). Es una de las más numerosas descritas hasta la fecha, agrupando a aquellas proteínas que presentan, en su estructura, el denominado dominio de unión al nucleótido o ATP (*NBD - Nucleotic Binding Domain*).

Las proteínas ABC son de gran importancia para cualquier sistema vivo y se caracterizan por la presencia del dominio transmembrana (TMD) y un dominio de unión al nucleótido o NBD, donde se pueden localizar regiones altamente conservadas como el Walker A y B, el motivo C o firma ABC y los bucles o *loops* A, Q, D y H (Linton & Higgins, 2007).

1. Introducción

La especificidad de las moléculas transportadas viene determinada por los TMD, mientras que la energía aportada para el transporte se obtiene de la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP) en el NBD (Ambudkar & Gottesman 2006).

A este grupo de proteínas se le atribuyen gran variedad de funciones, aunque realmente la misión concreta de muchas de ellas todavía es desconocida. Algunos NBD han desarrollado el uso de la catálisis del ATP para diferentes funciones biológicas, como reparación de ADN o la exportación del núcleo del mRNA (Linton & Higgins, 2007), aunque gran parte de los miembros de esta superfamilia se caracteriza por estar implicada en el transporte de una gran variedad de sustratos (productos metabólicos, iones, péptidos, lípidos, aminoácidos, azúcares, vitaminas, esteroides, xenobióticos), a través de las membranas biológicas, tanto entre el citoplasma y el espacio extracelular como entre el interior de los orgánulos celulares eucariotas y el citosol (Higgins 1992; Dean *et al.*, 2001; Choudhuri & Klaassen, 2006).

Estos sustratos solo pueden ser desplazados unidireccionalmente, lo que conlleva un gasto de energía debido al excesivo tamaño que presentan para difundir a través de la membrana, o bien porque van en contra de los gradientes físico-químicos presentes.

Gracias a la facultad ATPasa de estas proteínas, el enlace fosfato es hidrolizado ($\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} = \text{ADP} + \text{P}_i$) y la energía liberada se emplea en el transporte del sustrato, a través de las membranas biológicas (Higgins, 1992).

En procariotas estos transportadores mueven nutrientes esenciales que no pueden ser captados por difusión como azúcares, vitaminas o iones metálicos (Saurin *et al.*, 1999), mientras que, en eucariotas, la mayor parte de los genes ABC se encargan del transporte desde el citoplasma al exterior de la célula o al interior de los compartimentos intracelulares (Dean *et al.*, 2001).

Los importadores ABC son característicos de procariotas y emplean una proteína periplasmática de unión (PBP) para permitir la unión de los sustratos se-

1. Introducción

lectivamente y con una elevada afinidad, favoreciendo la especificidad de la reacción de transporte. Los exportadores ABC, presentes en todas las especies, movilizan los sustratos directamente del citoplasma a través de la membrana de las células o de los orgánulos (Linton & Higgins 2007).

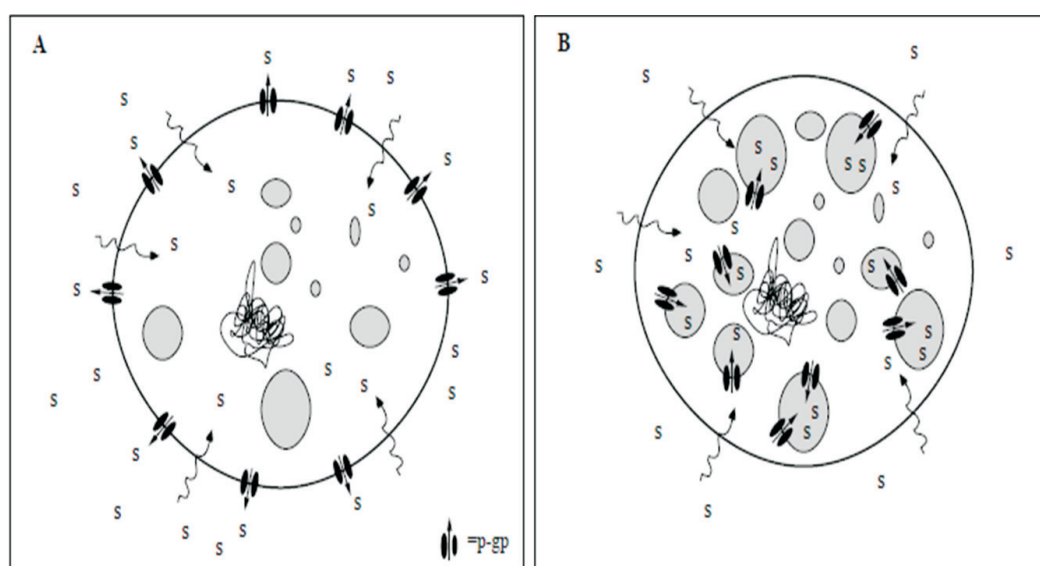


Figura 17: Modelo simplificado de la actuación de la P-glucoproteína (P-gp). La principal respuesta y actividad se produce en la membrana plasmática, el sustrato (S) entra por difusión pasiva al citosol y es transportado activamente al exterior de la célula (A), o al interior de los orgánulos (B) contra gradiente de concentración (Svensson, 2003a).

Higgins *et al.*, en 1982, son los primeros en clonar y secuenciar, en la bacteria *Salmonella typhimurium*, la histidina permeasa, el primer transportador ABC secuenciado. A partir de aquí, el descubrimiento de nuevos transportadores de la familia ha sido constante, siendo, actualmente, una de las mayores familias de proteínas transmembrana, presente en todas las células de todas las especies estudiadas, desde eubacterias a organismos eucariotas superiores (Higgins, 1992; Saurin *et al.*, 1999).

La descripción de nuevos miembros de la familia y la localización de estas proteínas en otros organismos ha sido relativamente sencilla, debido a la gran conservación que se descubrió en la secuencia de los fragmentos que codifican para los dominios de unión al ATP. Se encontró una gran homología en-

1. Introducción

tre nucleótidos y aminoácidos de ciertas regiones que están muy conservadas (Dean *et al.*, 2002).

En la familia de transportadores ABC en humanos, se han identificado 48 genes y se han clasificado por análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas de los NBD en 7 subfamilias, nombradas de la A a la G (número de miembros entre paréntesis): ABCA (12), ABCB (11), ABCC (12), ABCD (4), ABCE (1), ABCF (3), and ABCG (5) (Allikments *et al.*, 1996). Están caracterizadas por presentar al menos un dominio transmembrana, cuyos TMD están formados por entre cinco y seis α -hélices, que atraviesan la bicapa lipídica del lado citosólico al espacio extracelular, y una zona de unión al ATP o *nucleotide binding domain* (NBD). Un transportador funcional completo consta de 2 NBD y 2 TMD.

Cada uno de los NBD contienen dos motivos estructurales altamente conservados, llamados Walker A y Walker B, presentes en todas las proteínas ABC. Entre ambos, se localiza un motivo adicional, exclusivo de estos transportadores, la firma ABC o motivo C (Hyde *et al.*, 1990) (Figura 18). Los Walker A y B están altamente involucradas en la reacción de hidrólisis del ATP para el transporte del sustrato. En el Walker B, el residuo conservado ácido glutámico (E), junto al residuo conservado de ácido aspártico (D), son directamente responsables de la rotura del enlace fosfodiéster durante la hidrólisis de ATP.

Esta propuesta se fundamenta en observaciones de la estructura tridimensional, en alta resolución, de estos transportadores ABC, que muestran que el ácido glutámico parece estar en una posición ideal para activar un ataque a la molécula de agua (Orelle *et al.*, 2003; Frelet & Klein, 2006). El motivo C (fragmento de 12 residuos, el cual suele comenzar con secuencia LSGGQ) está fuertemente conservado a lo largo de la evolución, por lo que se supone que desarrolla un importante papel en el mecanismo de transporte (Frelet & Klein, 2006).

Se piensa que está implicada en los cambios conformacionales que tienen lugar en los dominios de membrana para el transporte de los sustratos (Hyde *et*

1. Introducción

al., 1990), debido a la presencia de un residuo de serina (S) necesario para la interacción entre el Walker A y el motivo C, probablemente relacionado con el fosfato del ATP (Leslie *et al.*, 2005). Además de estos tres motivos conservados, existen otros: el *A-loop* un residuo aromático altamente conservado, que interactúa con el anillo de adenina del ATP, situado aproximadamente unos 25 aminoácidos antes del Walker A y que es esencial para la unión al ATP (Ambudkar *et al.*, 2006).

El *Q-loop* está situado entre el Walker A y el motivo C, y contiene una glutamina (Q). Esta posición acopla los lugares de unión al ligando de los TMD, a los lugares de unión al ATP, en los NBD, y forma puentes de hidrógeno con el Mg^{2+} y el H_2O (Linton, 2007). Después del Walker B, está el *D-loop*, que presenta un ácido aspártico (D). Finalmente, se localiza el *H-loop*, que posee una histidina (H).

Independiente de la dirección del transporte (absorción o excreción), o la naturaleza del sustrato a transportar (de bajo o elevado peso molecular), los transportadores ABC, generalmente, están compuestos por cuatro dominios: dos dominios transmembrana hidrofóbicos (TMD) y dos dominios de unión al nucleótido o ATP, hidrofílicos (*Nucleotide Binding Domains* - NBD).

Los dominios transmembrana varían considerablemente entre las diferentes proteínas ABC, mientras que los dominios de unión al ATP se encuentran altamente conservados dentro de esta familia, aunque presentan motivos característicos que permiten distinguir entre las diferentes subfamilias (Higgins, 1992). Los TMD atraviesan la membrana de 6 a 12 veces vía α -hélices y proporcionan la especificidad por el sustrato (Dean *et al.*, 2001). Los NBD se localizan en el citoplasma de las células donde se unen e hidrolizan los ATP y usan la energía liberada para el transporte de los sustratos (Dean *et al.*, 2001, Linton, 2007).

En la Figura 18, de la página siguiente, puede verse la estructura y acción de las proteínas ABC.

1. Introducción

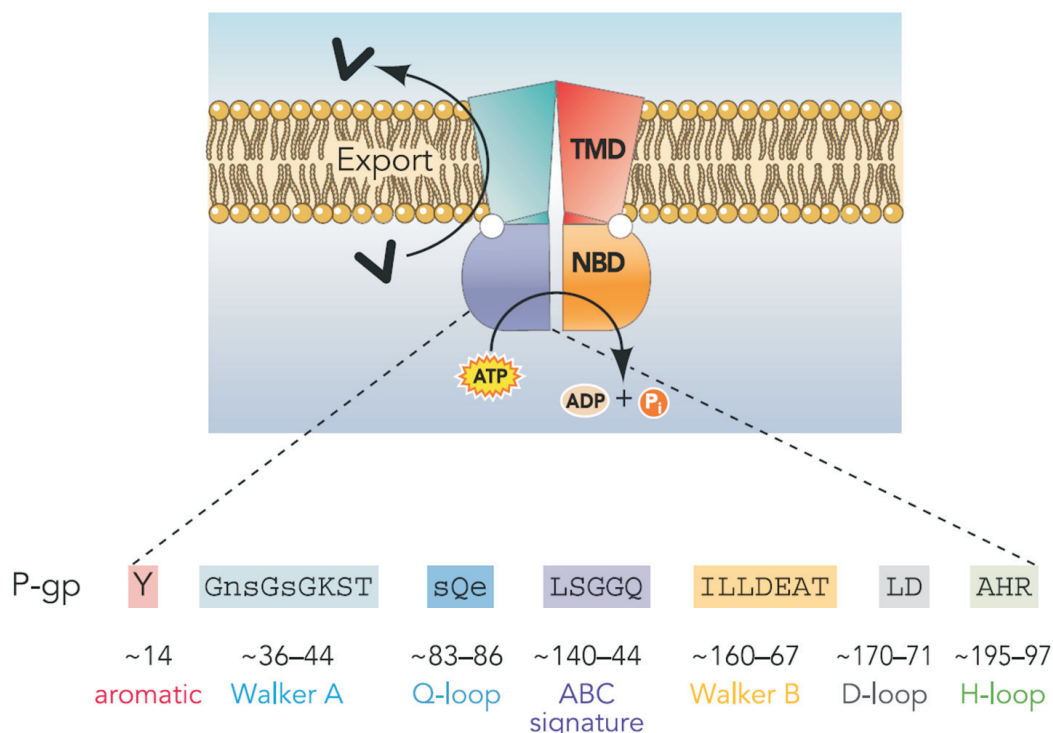


Figura 18. Estructura y acción de las proteínas ABC. Los NBD (dominio de unión al ATP) se mantienen uniformes entre las diferentes proteínas ABC, presentando motivos altamente conservados (Walker A, Walker B y motivo C). Además, es donde tiene lugar la hidrólisis del ATP y la obtención de energía para el transporte de los sustratos (obtenido a partir de Linton, 2007).

1.4.1. Subfamilia ABCB

En humanos, la subfamilia ABCB, a la que pertenece la P-gp, está formada por once miembros. Cuatro de ellos son transportadores completos de alrededor de 1300 aminoácidos, que serían la ABCB1 (MDR1), ABCB4 (MDR2/3), ABCB5 y ABCB11, conocida como BSEP (*Bile Salt Export Pump*) o sP-gp (*sister* de la P-glucoproteína); los demás son semitransportadores (Figura 19). El modelo estructural de estas proteínas mantiene una organización común a las de la familia. Los transportadores completos presentan una estructura habitual con dos NBD citoplasmáticos y dos dominios transmembrana (TMD), mientras que los semitransportadores, con solo un NBD y un TMD, se unen con otros para crear un polipéptido funcional completo (Hyde *et al.*, 1990).

1. Introducción

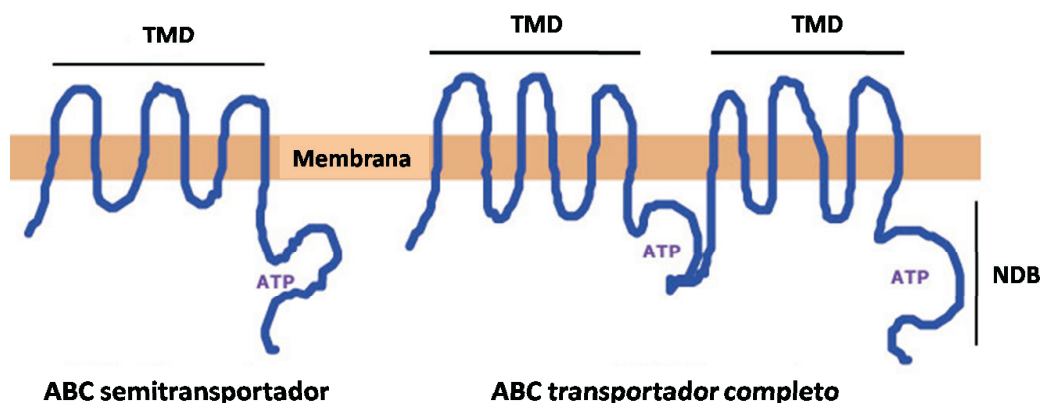


Figura 19. Modelos de las estructuras de un transportador y un semitransportador ABCB (modificado a partir de Kemp, 2011).

La ABCB1, conocida como MDR1 o P-gp, fue la primera en ser estudiada y caracterizada por su capacidad de conferir la mutiresistencia frente a fármacos/drogas (Chen *et al.*, 1986). Está compuesta por dos mitades con un alto grado de similitud entre ellas. Cada mitad presenta un dominio transmembrana (TMD) hidrofóbico, con 6 α -hélices que atraviesan la bicapa lipídica y un dominio de unión al ATP (NBD), hidrofílico y localizado en el interior de la célula.

Parece ser que estas proteínas se han originado por un evento de duplicación de un gen primordial, con la unión entre sí de dos mitades homólogas, cada una con seis fragmentos transmembrana en posición N-terminal, seguido de un dominio de unión al ATP (Bard, 2000; Hennessy & Spiers, 2007).

El fenómeno MDR (*multidrug resistance*) fue descrito por primera vez por Dano en 1973, al observar la eliminación de fármacos en células tumorales. Tres años después, Juliano & Ling demostraban la presencia de una glucoproteína de 170 kDa, que confería protección frente a agentes anticáncer en células mutantes tumorales de ovarios de hámster.

Se observó que son unas proteínas fuertemente expresadas en células tumorales, aunque también en tejidos de protección y excreción. Actúan limitando y regulando la absorción, eliminando y controlando la distribución de drogas y

1. Introducción

otros tóxicos en los tejidos (Fromm, 2004). Se conocen como P-glucoproteína debido a la permeabilidad que presentan frente a drogas (por lo que se designa con la 'P'), mientras que "glucoproteína" es debido al alto grado de glucosilación que muestra (Epel, 1998).

En algunas especies, se han descrito proteínas homólogas y se ha confirmado como un importante mecanismo de defensa frente a tóxicos xenobióticos en organismos acuáticos. En humanos hay dos genes *mdr*, funcionalmente diferentes, que codifican para la P-gp (*MDR1* y *MDR3*, también conocido como *MDR2/3*), mientras que en roedores se han localizado formas parálogas codificadas para uno de estos genes, por lo que hay tres genes MDR (*Mdr1a*, *Mdr1b* y *Mdr2*).

La P-gp es codificada en humanos por *mdr1* y en ratón para *mdr1a* y *1b*, y confieren una resistencia constitutiva e inducible a tóxicos, mientras que *mdr3* de humanos y *mdr2* de ratón codifican para flipasas tranlocadoras de fosfolípidos (Leslie *et al.*, 2005; Choudhuri & Klaassen 2006). También se han descrito dos P-gp en peces (*Pleuronectes americanus*, *Fundulus heteroclitus*), donde la P-gpA correspondería con la s-P-gp (ABCB 11), mientras que la P-gpB estaría relacionada con las dos MDR de mamíferos (Bard, 2000).

Esta proteína de membrana actúa como una bomba dependiente de energía que exporta determinadas moléculas al exterior de las células y limita la entrada de compuestos nocivos. En un experimento con roedores con la proteína MDR1a bloqueada, se observó que provocaba un efecto marcado en la eliminación y distribución de las toxinas, sugiriendo que esta proteína ayuda a mantener la integridad de los tejidos barrera y la prevención en la acumulación de xenobióticos (Bard, 2000).

El transporte se realiza a través de un canal que se forma en la membrana plasmática, constituido por los doce segmentos transmembrana. Los sustratos que transportan comparten las características de moléculas moderadamente hidrofóbicas o anfipáticas, planares, neutras o catiónicas, generalmente no conjugadas.

1. Introducción

La estructura tridimensional fue descrita por primera vez por Rosenberg (1997). Los TMD forman un poro en la membrana que origina una cámara central alargada. En estado basal, está abierto en la cara extracelular, pero cerrada hacia la zona que da al interior de la célula, con los dos NBD expuestos como lóbulos citoplasmáticos. Se ilustra en la Figura 20:

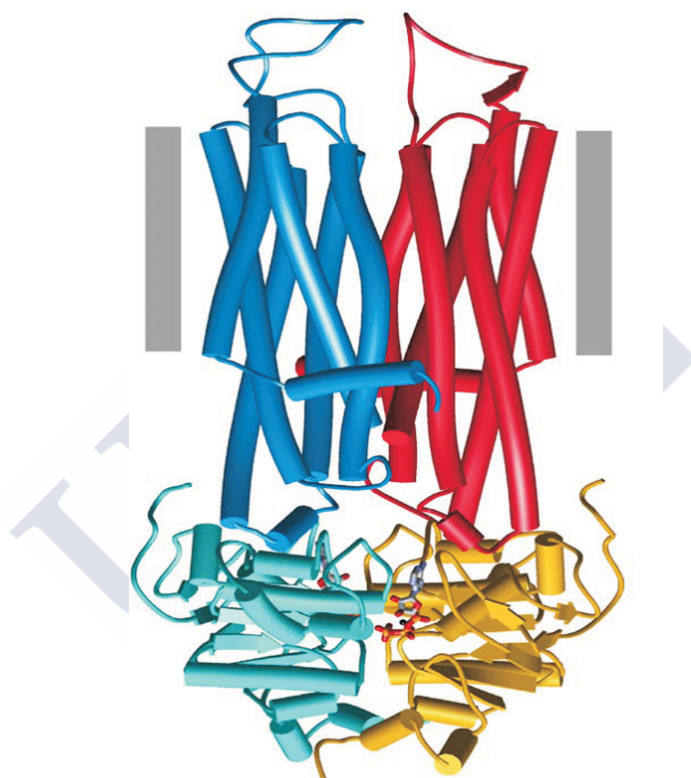


Figura 20. Representación esquemática de la P-glucoproteína. Los NBD, coloreados de azul claro y amarillo, muestran una conformación de dímero cerrado. Los TMD, en azul oscuro y rojo, forman una cámara acuosa embebida en la membrana. Los rectángulos grises indican el plano en el que está orientada la membrana. (Linton & Higgins, 2007).

El cambio conformacional de la proteína provoca la apertura de una cavidad central en la región TMD, que forma una ruta a través de la cual los sustratos atraviesan la membrana, y también se crea un lugar de unión del sustrato que contribuye a la especificidad del transporte. La estructura recuerda a un embudo con la zona más estrecha en la cara citosólica y la más ancha de aproximadamente 50 Å, hacia el lado extracelular, que es la zona de baja afinidad y liberación del sustrato. La región central, donde está la zona de alta afinidad

1. Introducción

del sustrato, tiene un diámetro que va de 9 a 25 Å (Ambudkar & Gottesman, 2006).

Estos transportadores catalizan el paso de las moléculas a través de la membrana biológica en varias fases. Existe un modelo general del proceso, aunque todavía no está claro del todo, y hay modelos que han propuesto algunas variaciones.

En primer lugar, la molécula que se va a transportar se acopla al lugar de alta afinidad de los TMD. Este hecho hace que se mande una señal a los NBD, que provoca su apertura, favoreciendo una unión de cooperación de las dos moléculas de ATP. Así se causa la dimerización de los NBD y se adopta una conformación cerrada. La unión del sustrato a la proteína está fuertemente relacionado con el TMD1 (Hennesy & Spiers, 2007).

A continuación, los cambios conformacionales necesarios para adoptar ese estado son transmitidos al TMD, provocando la exposición de los lugares de unión del sustrato hacia la cara extracelular y su afinidad por el sustrato se reduce, siendo este liberado al exterior.

El ATP es hidrolizado para proveer energía para la ruptura del dímero de los NBD y formar un estado intermedio. Finalmente, la liberación del Pi y el ADP devuelve al transportador a su configuración basal de alta afinidad por el sustrato (Chen *et al.*, 2001; Linton, 2007).

Al haber dos dominios de unión al nucleótido, serán hidrolizadas dos moléculas de ATP de forma secuencial; una de ellas está implicada en el cambio que permite el traslado de los sustratos al exterior de la célula, mientras que la otra devuelve la configuración del transportador a su estado original, presentando de nuevo una elevada afinidad por el sustrato. Los tres pasos energéticos (unión del ATP, hidrólisis y liberación del Pi + ADP) están asociados con cambios conformacionales en el transportador.

1. Introducción

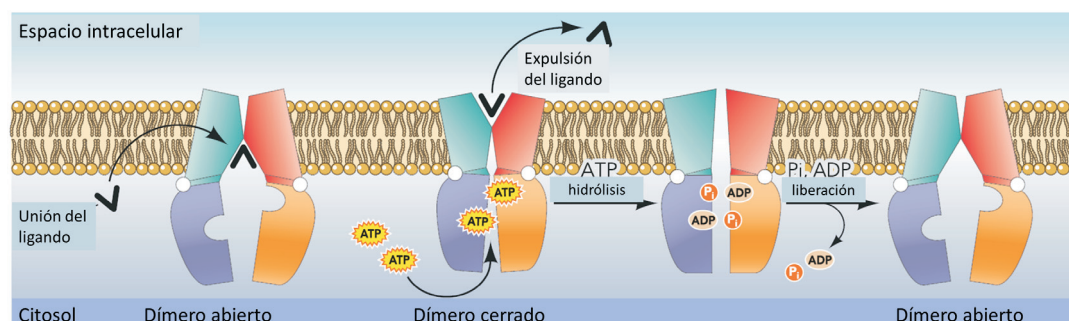


Figura 21. Fases del transporte de sustancias por la P-glucoproteína. El sustrato se une a la zona de alta afinidad en el canal formado por los dos TMDs. Esta unión induce un cambio en la estructura de los NBDs, que tendrán mayor afinidad por el ATP. La unión de los ATPs provoca una configuración de dímero cerrado de los NBDs. La energía liberada por el cierre del dímero de los NBD causa un nuevo cambio en los TMD y el sustrato es expulsado. La hidrólisis de ATP proporciona energía para la ruptura del dímero de los NBD, formando un estado intermedio. Finalmente, la liberación del Pi y el ADP consiguen que el transportador vuelva a su estado basal de dímero abierto (modificada a partir de Linton, 2007).

Con el fin de conocer la función que desarrollan las regiones o motivos altamente conservados, se han realizado estudios que se basan en observaciones de la variación natural de estas proteínas y los polimorfismos encontrados. Sin embargo, la mutagénesis dirigida se ha utilizado como una herramienta para poder identificar la función de algunos aminoácidos, que no se ven alterados por la variación natural. Además, ha permitido estudiar ciertas mutaciones relacionadas con los transportadores ABC y el efecto que acarrea la sustitución de un aminoácido particular por una gama de diferentes aminoácidos, pudiendo así analizar su especificidad.

Frelet & Klein (2006) realizaron una revisión de la función de los transportadores ABC por análisis mutacionales, observando que la inactivación de las reacciones de hidrólisis de ATP por mutaciones en regiones conservadas, como los Walker A y B, provocan una pérdida del transporte del tóxico/fármaco en las células. Estas conclusiones se obtuvieron de varios estudios, como el de Azzaria *et al.* (1989), donde se mutaron los residuos de glicina y lisina en las posiciones 431/1073 y 432/1074 en el Walker A de ambos NBD de MDR1 en ratón, demostrando que la unión del ATP se vio afectada en los mutantes. La mutación del residuo de lisina en cualquiera de los NBD neutralizó las actividades ATPasa de la proteína MDR1. Urbatsch *et al.* (1998) también realiza-

1. Introducción

ron investigaciones con mutagénesis de la proteína MDR1, en humanos, de los residuos C431 y C1074, mostrando que mutaciones en estas cisteínas son responsables de la inhibición de las uniones disulfuro entre los dos NBD.

En los Walker B de ambos NBD, Hycyna *et al.* (1999) estudiaron los residuos D555 y D1200 que están presumiblemente involucrados en la unión del Mg^{+2} . Ambas mutaciones no afectan a la capacidad del transportador para unirse al sustrato, pero sí a la función de transporte y las actividades ATPasa, tanto basal como la estimulada por el tóxico. Esto sugirió que los dos NBD, de forma aleatoria, hidrolizan ATP, aunque existe una cooperatividad catalítica obligatoria, por lo que la inhibición de la hidrólisis de ATP en una de las zonas catalíticas inhibe la hidrólisis en la otra.

Urbatsch *et al.* (1998) mostraron la importancia de los residuos catalíticos carboxilados altamente conservados E552 (NBD1) y E1197 (NBD2) en la MDR3 de ratón, posiblemente implicados en la iniciación o en otros aspectos de la hidólisis. Estos residuos homólogos, asociados a D551 y D1196, coordinan la unión de Mg^{+2} en cada zona: Las mutaciones de D551 y D1196 anulan el transporte y la resistencia frente a tóxicos mediada por la P-gp.

Loo *et al.* (2002) realizaron estudios sobre el motivo C, observando que una mutación simple de serina a cisteína, en cualquiera de los NBD de la MDR1 en humanos, causa la pérdida parcial de la actividad de la ATPasa. Los papeles funcionales de las dos secuencias de la firma ABC "LSGGQ" se estudiaron mediante la mutación de serina a alanina (Tomblin *et al.*, 2004), viendo que se reduce la fuerza de interacción con el estado de transición químico específico, como mostraron con experimentos de captura con vanadato-ADP y berilio-ADP.

Ambudkar *et al.* (2006), tras realizar un alineamiento en diversas ABC de humanos, plantas, hongos y bacterias, describieron el *A-loop*, confirmando que el residuo aromático presente en el NBD2 es la tirosina (Y), mientras que, en el NBD1, también aparece con frecuencia el triptófano (W) o la fenilalanina (F). Varios grupos han estudiado los efectos bioquímicos de la mutación de

1. Introducción

este residuo en varias proteínas transportadoras ABC. Un ejemplo podría ser la mutación Y16S en la subunidad Hisp de la histidina permeasa bacteriana, que anuló la hidrólisis del ATP y su función de transporte (Shyamala *et al.*, 1991).

Ambudkar *et al.* (2006) realizaron varias mutagénesis dirigidas del residuo conservado de tirosina, en ambos NBD de la P-gp, en humanos. La tirosina fue cambiada por residuos alternativos aromáticos, por una mutación no conservativa y por una sustitución polar. Ninguna de las mutaciones afectó a la expresión de la proteína en la superficie celular, lo que permitió la caracterización de las interacciones proteína-nucleótidos para todas estas sustituciones. La sustitución por aminoácidos aromáticos no provocó efecto sobre la función del transporte, siendo tolerada.

Por otra parte, cuando se cambiaron por una mutación no conservativa y una sustitución polar, en cualquiera de los NBD, se vio reducido significativamente el transporte o fueron anuladas la hidrólisis y la unión del nucleótido, lo que también influyó en la función de transporte. Además, se ha sugerido que la importancia de los residuos aromáticos conservados también puede estar relacionada con el papel que desempeña el NBD en el que se encuentran.

También se analizaron mutaciones en regiones fuera del NBD y se encontraron diferentes residuos que son importantes para la unión al sustrato: S222 (TM4), I306 (TM5), L339 y A342 (TM6), I868 y G872 (TM10), F942 y T945 (TM11) y L975, V982 y A985 (TM12). Las mutaciones F335 (TM6) y F983 (TM12) provocan una alteración en la resistencia a xenobióticos. Una mutación en la P709 afectaba a la integridad estructural de la proteína. Ciertos residuos de glicina desempeñan papeles importantes en la estructura y la función, por ejemplo, G185. Como se puede observar en muchos casos, las mutaciones individuales provocan cambios de afinidad y variaciones en la actividad de transporte hacia el sustrato seleccionado (Frelet & Klein, 2006). Finalmente, cabe destacar que la similitud funcional implícita, entre los dos NBD, corresponde a la identidad de la secuencia, siendo corroborada por el

1. Introducción

hallazgo de una P-gp mutante, con una segunda copia de NBD1 en lugar del NBD2, que todavía podría transportar sustancias.



2. OBJETIVOS

La multirresistencia frente a xenobióticos (MXR) en organismos acuáticos expuestos a toxinas o contaminantes antropogénicos es un fenómeno muy estudiado en los últimos años, confirmándose que este mecanismo es debido en gran medida a la activación de unas proteínas transportadoras de membrana, pertenecientes a la superfamilia de proteínas ABC, especialmente la P-glicoproteína (P-gp, ABCB1, MDR1).

A causa del papel que adoptan frente a la presencia de tóxicos, se empezó a analizar su presencia y funcionalidad en diversos bivalvos marinos (Eufemia & Epel, 2000; McFaden *et al.*, 2000; Smital *et al.*, 2003; Eufemia *et al.*, 2002; Pain & Parant, 2003a; Franzelliti & Fabbri, 2006), corroborándose la activación del sistema frente a diferentes moléculas contaminantes.

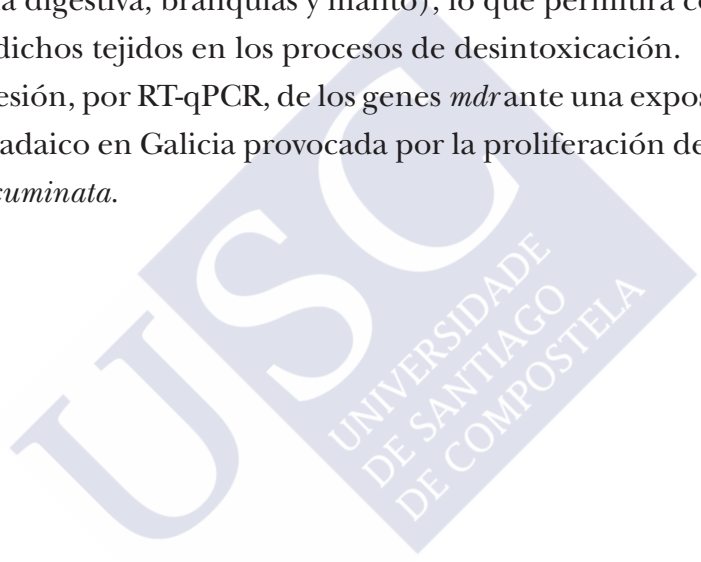
La glándula digestiva, las branquias y el manto están implicados en diversas funciones biológicas, incluyendo respiración, metabolismo (biotransformación) y excreción, pudiendo actuar como barreras entre los mejillones y los contaminantes externos. Por esta razón, es interesante conocer y evaluar la expresión de estos genes en dichos tejidos, lo que permitiría observar si realmente se inducen estos mecanismos frente a la presencia de toxinas y qué papel tiene los distintos tejidos en respuesta a esta agresión.

El **objetivo principal** de este trabajo es confirmar la presencia de genes de tipo *mdr* implicados en la multirresistencia frente a xenobióticos (MXR), en distintos tejidos del mejillón *Mytillus galloprovincialis*, y analizar su expresión durante los procesos de desintoxicación celular, cuando están expuestos a una situación de contaminación natural por la presencia de toxinas de tipo DSP, principalmente ácido okadaico. Este objetivo se estructurará en base a la obtención de los siguientes objetivos parciales:

- Obtener la secuencia nucleotídica completa de los cDNA que codifican para proteínas de tipo MDR, utilizando diferentes técnicas de biología molecular (PCR, RACE-PCR, clonación y secuenciación). Esto nos permitirá caracterizarlas, identificar los diferentes dominios funcionales presentes y compararlas con proteínas similares de otros organismos.

2. *Objetivos*

- Buscar genes de referencia adecuados para realizar los análisis de expresión de los genes *mdr* por transcripción inversa, seguida de PCR en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR). Dichos genes de referencia deben expresarse de una forma estable en todos los tejidos, o a lo largo de todo el proceso experimental y son necesarios para normalizar los datos de expresión.
- Estudiar la expresión, por RT-qPCR, de los genes *mdr* en diferentes tejidos del animal (glándula digestiva, branquias y manto), lo que permitirá conocer la implicación de dichos tejidos en los procesos de desintoxicación.
- Estudiar la expresión, por RT-qPCR, de los genes *mdr* ante una exposición natural al ácido okadaico en Galicia provocada por la proliferación de microalgas *Dinophysis acuminata*.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material

Los materiales empleados en esta investigación han sido los siguientes:

Material de vidrio

- Botellas de 1000, 500, 200, 100 y 20 ml
- Matraz aforado
- Probetas aforadas
- Vasos de precipitados
- Macropipeta
- Matraz Erlenmeyer
- Tubos de ensayo estériles con tapón

Material fungible

- Asas de siembra
- Cinta
- Cuchillas estériles
- Filtros estériles 0.2 μm para jeringuillas Sartorius Minisart
- Guantes de nitrilo
- Palillos esterilizados de madera
- Parafilm[®]
- Placas qRT. 96-well full C/C. BioRad[®]
- Tubos de ensayo de poliestireno Greiner Bio-one estériles con tapón
- Tubos de PCR 200 y 500 μl
- Columnas con filtro
- Criotubos "COP NUNC"
- Films selladores. PCR sealers. Microseal "B" film. BioRad[®]
- Guantes estériles
- Jeringuillas de 5 y 10 ml
- Papel de aluminio
- Placas Petri
- Puntas de pipeta con y sin filtro estériles
- Tubos de microcentrífuga con columna con filtro
- Tubos *Eppendorf* 1,5 y 2 ml

Material electrónico

- Agitadores HCS02 Bibby, RH basic IKA Labortechnik
- Balanza de precisión HF-300G
- Autoclave Mediaclave P-selecta
- Baño Julabo[®] 13

3. Materiales y métodos

- Cámara de aire con luz UV Burdinola[®] AV100
- Campana extractora Burdinola NST 1200
- Congeladores de -20°C y -80°C
- Estufa Memmert[®]
- iCycler iQ[™] machine (BioRad[®])
- Medidor de pH Gilson[®] GLP21
- Microondas Whirpool[®]
- Nevera
- Spin
- Thermomixer 5436 *Eppendorf*[®]
- Vortex Heidolf[®] Reax top
- Cámara de imágenes LAS-3000 V2.2 (Fujifilm)
- Centrífuga refrigerada Hettich 24-48R
- Cronómetro
- Fuentes de alimentación para electroforesis Power Pac 300 BioRad[®]
- Incubador Selecta con plataforma agitadora Innova 2000
- Microcentrífuga Spin Qualitron Inc
- Nanodrop spectrophotometer 1000 (Thermo Scientific)
- PC
- Termociclador T1 y T-gradient Thermocycler Biometra[®]
- Transiluminador BioRad[®] UV 2000

Otro material

- Agitadores magnéticos
- Bandejas de plástico
- Cubetas de electroforesis BioRad[®]
- Gafas de metacrilato
- Homogeneizadores *Eppendorf*[®] de plástico
- Peines de electroforesis
- Tijeras
- Bandejas de electroforesis
- Cántara de transporte de nitrógeno líquido
- Cuchillos
- Gradillas
- Micropipetas *Eppendorf*[®] de 2,5, 10, 100 y 1000 μ l
- Pinzas

3. Materiales y métodos

Reactivos

- Ácido acético glacial 100%. MERCK
- Ácido clorhídrico fumante 37%. MERCK
- Agarosa D1. PRONADISA
- Agua destilada
- Agua PCR-grade. ROCHE
- Azul de bromofenol. MERCK
- Bactotripton. PRONADISA
- Cloruro de litio LiCl. AMBION
- Cloruro de sodio NaCl. MERCK
- Dietil pirocarbonato (DEPC). SIGMA
- Etanol 100%. MERCK
- Ficoll 400. MERCK
- Glucosa. MERCK
- Hielo
- IPTG. ROCHE
- Nitrógeno líquido. Servicio de criogenia (RIADIT), USC.
- Sacarosa. MERCK
- Tris Base. MERCK
- X-Gal. ROCHE
- Ácido bórico. MERCK
- Agar bacteriológico americano. PRONADISA
- Agarosa MS-8. PRONADISA
- Agua MiliQ (Millipore 0,22 μm)
- Ampicilina. SIGMA
- β -Mercaptoetanol. SIGMA
- Bromuro de etidio. HAMHEIM
- Cloruro de potasio KCl. MERCK
- dNTPs (desoxinucleótidos trifosfato). ROCHE/ PROMEGA
- EcoRI-endonucleasa de restricción. ROCHE
- Extracto de levadura. PRONADISA
- Glicerol. PANREAC
- *Glyoxal Load Dye*. AMBION
- Hidróxido de sodio NaOH. MERCK
- Magnesio Mg^{+2}
- N,N-Dimetilformamida. SIGMA
- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). SIGMA
- Tri-Triplex III. MERCK
- Xileno-Cianol. MERCK

3. Materiales y métodos

Kits comerciales (Anexo 8.1. Esquemas de los protocolos)

- *Advange 2 Polymerase Mix.*
CLONTECH
- *DNA-Zap™.* AMBION
- *HotMaster™ Taq DNA Polimerasa.*
EPPENDORF
- *MinElute® Gel Extraction Kit.* SIGMA /
Qiagen
- *NucleoSpin® RNA II kit.*
MACHEREY-NAGEL.
- *Platinum Taq DNA Polymerase.*
INVITROGEN
- *RNA-Later®.* AMBION
- *RNAse Zap®.* AMBION
- *SuperScript® III First Strand Synthesis.*
INVITROGEN
- *Turbo DNA-Free™.* AMBION
- *Gen Elute Plasmid Miniprep.*
SIGMA
- *Marcadores moleculares.* ROCHE
- *Nucleo Spin® Extract II.*
MACHEREY-NAGEL
- *pGEM®- T Easy Vector II.*
PROMEGA
- *Primer pUC / M13 Forward y re-
verse.* INVITROGEN
- *Ambion® RNA-Storage Solution.*
- *SMARTer™ RACE cDNA Amplifi-
cation kit.* CLONTECH

3. Materiales y métodos

3.2. Preparación de medios

Se realizan las preparaciones en una campana de flujo laminar para evitar contaminaciones.



Figura 21: Campana de flujo laminar

Preparación de cebadores

Se reciben liofilizados en tubos de plástico. Preparamos la “solución stock” diluyendo, en la cantidad necesaria de agua, MiliQ estéril, para obtener una concentración final de 100 μM . Esta es diluida otras diez veces en agua MiliQ, para conseguir alícuotas de una concentración de 10 μM , que serán las “soluciones de trabajo”.

3. Materiales y métodos

Preparación de dNTPs

Para un volumen de 100 μ l, añadiríamos a 60 μ l de agua *PCR grade water*, 10 μ l de cada uno de los nucleótidos, para una concentración final 10 mM de cada uno (dATP, dGTP, dCTP y dTTP).

Gel de agarosa

Se prepara la concentración adecuada de agarosa (entre el 1 y el 3%), según el tamaño esperado de los fragmentos de DNA (cuanto más pequeños sean, la solución será más concentrada).

Se monta la bandeja de electroforesis, cerrando los laterales con cinta y colocando el peine que se necesite en cada situación. Para un gel al 1% de 100 ml de tampón TAE, se le añade 1g de agarosa; si fuese al 2%, serían 2g (normalmente será la D1 o de baja electroendósmosis, mientras que la agarosa MS-8 se utiliza para separar fragmentos pequeños).

Para que se disuelva bien, se calienta en el microondas. Una vez que se enfría, pero antes de que solidifique, se añaden 5 μ l de la solución de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml, que es un colorante que se une a la doble cadena de DNA y emite fluorescencia cuando es excitado con luz ultravioleta.

Para geles desnaturalizantes de RNA, usaremos tampón TBE en vez del TAE.

Solución de bromuro de etidio

Son 10 mg de bromuro de etidio por cada ml de agua MiliQ. Se deja en agitador hasta que se homogeneice bien. Se conserva a temperatura ambiente, pero en tubos cubiertos de papel de aluminio para protegerlos de la luz.

3. Materiales y métodos

Tampón TAE 50x (volumen 1l)

242 g de Tris base + 57,1 g de ácido acético glacial + 100 ml EDTA 0,5M (pH 8). Se lleva hasta 1 litro con agua MiliQ y se almacena en botellas de vidrio ámbar a temperatura ambiente.

Tampón TBE 5x (volumen 1l)

54 g de Tris base +27,5 g de ácido bórico +20 ml 0.5 M EDTA 0,5M (pH 8).

Se lleva hasta 1 litro con agua MiliQ y se ajusta a pH 8 con HCl. Se conservan en botellas cubiertas de papel de aluminio en la nevera.

EDTA 0,5M (pH 8)

Se mezclan bien 186,1 g Tri-triplex III + 900 ml agua MiliQ y se ajusta a pH 8 con NaOH. Finalmente, se lleva a 1 L con más agua MiliQ y se autoclava.

Marcadores moleculares

Se emplea una proporción 2 (patrón de peso molecular): 2 (agua miliQ), 1 (tampón de carga).

Tampón de carga

A un volumen x de agua miliQ se le añade 20% Ficoll + 0.25% azul de bromofenol (rápido) y/o xilenocianol (lento), que son colorantes que ayudan a ver cómo transcurre la electroforesis. Según el tamaño del fragmento esperado, se usará uno u otro.

Por ejemplo, para 10 ml, se necesitan 2 g de Ficoll y 25 mg de colorante. Si el fragmento es pequeño, se desplazará rápido, por lo que se debería usar xilenocianol para que no oculte las bandas.

3. Materiales y métodos

Medio LB o Luria-Bertani (volumen 1l)

A 1 litro de agua MiliQ se añaden 5 g de extracto de levadura + 10 g de bacto-triptona + 5 g de NaCl. Se ajusta a pH 7 y se autoclava a 120°C durante 20 minutos.

Para medios LB sólidos, se añaden 15 g de agar bacteriológico antes de autoclavar. Normalmente, al enfriar, alrededor de los 50°C, se agregan 100 µl de ampicilina por cada 100 ml de medio.

Ampicilina

Es un antibiótico selectivo que se emplea en el cultivo de bacterias para evitar el crecimiento de determinadas colonias. El vector que se usa en la clonación presenta el gen *Amp^r* (Figura 30), que confiere resistencia a las células frente este antibiótico. Se prepara, a una concentración de 100 mg/ml en agua MiliQ, y se esteriliza por filtración (0,2 µm). Se preparan alícuotas de 1 ml y se mantiene congelado a -20°C. Para su uso, se descongela y añade al medio LB después de autoclavar.

Medio de cultivo SOC (volumen 20 ml)

0,4 g de bacto-triptona + 0,1 g de extracto de levadura + 0,2 ml de NaCl 1M + 0,05 ml de KCl 1M + 17 ml de agua MiliQ. Se autoclava y se añaden 0,2 ml de solución de Mg⁺² 2M y 0,2 ml de glucosa 2M. La esterilización se realiza por filtrado de 0,2 µm. Esta mezcla se lleva a 20 ml con agua MiliQ.

Medio de cultivo SOB (volumen 20 ml)

0,4 g de bacto-triptona + 0,1 g de extracto de levadura + 0,2 ml de NaCl 1M + 0,05 ml de KCl 1M y se lleva hasta 20 ml con agua MiliQ. Se deja enfriar y se añaden 0,2 ml de Mg²⁺ 2M.

3. Materiales y métodos

Solución Stock IPTG 0.1 M

Para un volumen de 50 ml, se añaden 1,2 g de IPTG en agua MiliQ. Se homogeneiza bien con el vortex y, a continuación, se filtra a través de un filtro de 0,2 µm de poro. Finalmente, se almacena en la nevera a 4°C.

Solución X-Gal

Se disuelven 100 mg de X-Gal en 2 ml de N,N-dimetilformamida. Se mezcla bien, se filtra la solución a 0,2 µm y se cubre el tubo con papel de aluminio, para evitar la luz directa. Se congela a -20°C.

Diluciones de etanol

Para obtener las distintas concentraciones de etanol que se necesitan a lo largo de toda la investigación, se parte de etanol al 100% o al 96%, que se diluye con la cantidad correspondiente de agua MiliQ. La dilución de alcoholes se lleva a cabo conforme a la tabla de Gay-Lussac (Gabe, 1968).

Tabla 3. Tabla de Gay-Lussac para la dilución de alcohol (Gabe, 1968).

Alcohol que se obtiene	Alcohol que se diluye								
	100,00	99,00	98,00	97,00	96,00	95,00	94,00	93,00	92,00
95,00	6,50	5,15	3,83	2,53	1,25				
90,00	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41	5,10	3,80	2,54
85,00	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	11,96	10,59	9,24
80,00	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	19,49	18,04	16,61
75,00	37,58	35,90	34,28	32,67	31,08	29,52	27,97	26,43	24,94
70,00	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	37,53	35,89	34,27
65,00	59,37	57,49	55,63	53,81	52,00	50,22	48,45	46,70	44,85
60,00	72,82	70,80	68,80	65,85	64,92	63,00	61,10	59,21	57,33
55,00	88,60	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	75,93	73,88	71,85

continúa...

3. Materiales y métodos

Alcohol que se obtiene	Tabla 3 (continuación)								
	Alcohol que se diluye								
	100,00	99,00	98,00	97,00	96,00	95,00	94,00	93,00	92,00
50,00	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	93,64	91,41	89,19
45,00	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	115,09	112,64	110,18
40,00	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	141,70	138,95	136,23
35,00	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	175,60	172,49	169,39
30,00	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	220,49	216,90	213,33
25,00	308,90	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	283,02	278,77	274,53
20,00	408,50	403,13	397,79	392,47	387,17	381,90	376,64	371,40	366,16
15,00	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	532,74	525,83	518,94
10,00	907,09	896,73	886,40	876,10	865,15	855,55	845,31	835,08	824,86

Modo de usar la tabla: se busca en la cabecera de la tabla el grado del alcohol que vamos a diluir y, en la primera columna vertical, el del alcohol que deseamos obtener; el número que corresponde al cruce de estas dos líneas indica la cantidad de agua, en centímetros cúbicos, que es preciso añadir a 100 centímetros cúbicos del alcohol que vamos a diluir.

3.3. Clonación, secuenciación y caracterización

3.3.1. Muestras

Para la obtención de las secuencias *mdr1* y *mdr2*, se recogieron un grupo de mejillones (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck, 1819) de una batea de las rías gallegas, concretamente de la ría de Ares-Betanzos, el 21 de junio de 2007. Las muestras fueron proporcionadas por el INTECMAR (Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño de Galicia. Xunta de Galicia. Consellería do Medio Rural e do Mar). Los individuos obtenidos fueron diseccionados y se les extrajo una muestra de manto, que se trató con *RNAlater*[®] para una mejor conservación del RNA. Se utiliza debido a que, al morir el animal, tiene lugar una autólisis celular en los tejidos por acción de enzimas endógenas, como las RNAasas que actúan degradando el RNA.

3. Materiales y métodos

Se cortaron unos trozos del tejido recién extraído con un grosor de, aproximadamente, 5 mm, a los que les fueron añadidos de 5 a 10 volúmenes del reactivo en tubos *Eppendorf*. Se dejaron las muestras en la nevera a 4°C hasta que el reactivo penetró bien, lo que dependía del tipo y tamaño de la muestra, aunque normalmente tarda un día. Una vez que el tejido quedó fijado, el sobrenadante fue eliminado y las muestras conservadas en un congelador a -20°C o -80°C.

Se ha de tener en cuenta también la presencia de RNAsas ambientales, que se localizan por las superficies de los lugares en los que se lleva a cabo el trabajo y en las herramientas que se utilizan. Debido a esto, es aconsejable realizar una limpieza con el kit *RNAZap*TM para inactivar las enzimas. Se aplica directamente sobre las superficies y aparatos que se vayan a usar y se limpia a continuación con agua destilada.

También es recomendable el uso de *DNAZap*TM para la prevención de contaminación por DNA en la PCR, degradando posibles RNA y DNA contaminantes de todo tipo de superficies. Se aplica la solución 1 sobre la superficie a limpiar y, sobre ella, la solución 2. Dejamos actuar por unos minutos y limpiamos con un papel. Luego se aclara con agua destilada y se seca bien.

3.3.2. Extracción del RNA Total

Se partió de una cantidad aproximada de 20 mg de manto para el aislamiento del RNA Total. El kit empleado para la extracción fue NucleoSpin[®] RNA II kit (Macherey-Nagel). Primero se homogeneizó la muestra en aproximadamente 350 µl de tampón RA1 + 3.5 µl de β-mercaptoetanol; a continuación, se filtró el lisado obtenido, con una centrifugación de 1 minuto a 11.000 g. La solución que se obtuvo se mezcló con 350 µl de etanol 70% y se pasó a la columna del kit que tiene una membrana de sílice, donde se debería unir el RNA. Se centrifugó 30 s y se añadieron 350 µl de tampón MDB *membrane desalting buffer*, para una posterior centrifugación, y tras ella se volvió a hacer otra, durante 1 minuto, para retirar posibles restos de los tampones.

3. Materiales y métodos

Después, se llevó a cabo una digestión del DNA, durante 15 minutos con 45 µl de rDNase reconstituida. Tras esto, se realizaron varios lavados con el fin de eliminar sales, metabolitos y componentes celulares macromoleculares. El primero, con 200 µl de tampón RA2, y después dos lavados más con RA3, al que previamente se le añadió el etanol 100% indicado, de 600 µl y 250 µl. Para los lavados, se empleó la centrífuga a 11.000 g con ciclos de 30 s, excepto en el último que fue de 1 minuto y una centrifugación adicional de 2 minutos para eliminar posibles restos. Finalmente, se hizo una elución en condiciones de baja fuerza iónica en agua libre de RNasas que libera el RNA de la membrana. Se diluyó por dos veces, aplicando 30 µl en el filtro y recogiendo la disolución, con centrifugaciones de 1 minuto.

Una precipitación selectiva del RNA, para eliminar el DNA que pudiera quedar, se llevó a cabo, usando medio volumen de cloruro de litio 7,5 M, que se dejó actuando durante media hora a -20°C. Tras esto, se añadieron 500 µl de etanol al 75% y se centrifugó a 4°C durante 15 minutos al máximo. El RNA debería quedar pegado a la pared del tubo, con lo que fue retirado todo el líquido y finalmente se diluyó en 50 µl de *RNA Storage Solution* (Ambion), para una mejor conservación.

Por si todavía quedara algún resto de contaminación de DNA, se llevó a cabo un tratamiento con *TURBO DNA-free*TM (Ambion). Este reactivo utiliza DNasa I que permite la digestión del DNA residual. Se añadieron 0,1 volúmenes de 10X Turbo DNase Buffer y 1µl de Turbo DNase. Se homogeneizó e incubó en el termociclador a 37°C durante 20-30 minutos. A continuación, se pusieron 0,1 volúmenes del reactivo de inactivación de la DNasa, previamente resuspendido. Se mezcló bien y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente (<22°C), mezclando un par de veces. Finalmente, se centrifugó a 10.000 g durante 1 minuto y medio y se recuperó el sobrenadante con el RNA en nuevos tubos.

La calidad y concentración final de RNA se verificó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Si la disolución obtenida no presentaba contaminación por DNA o proteínas, la relación de las absorbancias

3. Materiales y métodos

obtenidas a longitudes de onda de 260/280 nm deberían ser mayores a 1,7, siendo aconsejable que estén comprendidas entre 1,8 y 2,2, mientras que la relación 260/230 nm debería ser mayor que 1,6.

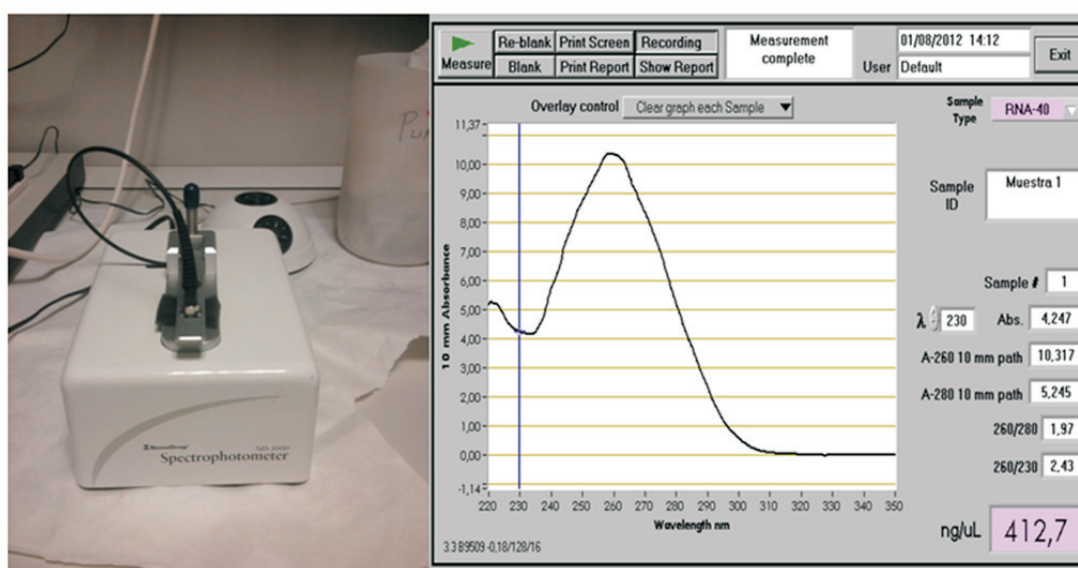


Figura 22: Nanodrop 1000 y gráfica generada en la medición de una muestra de RNA.

La integridad de las muestras se comprobó con una electroforesis en un gel desnaturante de agarosa al 1% en tampón TBE, donde se pudo observar si había algún tipo de degradación del RNA. Para ello, según la concentración de la que se partiera, se mezclaron entre 1 y 2 μ l de RNA con un volumen igual de *Glyoxal Load Dye* (Ambion) y se completaron con agua DEPC hasta 10 μ l. Se hizo lo mismo con un marcador molecular para poder calcular el tamaño de los fragmentos obtenidos y se incubaron durante media hora a 50°C.

Tras esto, se hace la electroforesis con todo el material bien limpio y tratado con *RNase ZAP*. Para una buena calidad, el gel debería mostrar una banda marcada correspondiente al RNA ribosomal 18S, que no se vea difuminada ni presente ningún tipo de mancha o *smears*. Las especies protóstomas, como el mejillón, generalmente no presentan la banda que representaría al RNA ribosomal 28S. Esto es resultado del fenómeno *hidden break*, que, bajo condiciones desnaturizantes, provoca la ruptura de la molécula en dos subunidades de

3. Materiales y métodos

igual tamaño y la banda 18S se hace más evidente, ya que las dos mitades del RNA 28S se superponen con ella, debido a que tienen una movilidad electroforética similar a la fracción 18S (Fujiwara & Ishikawa, 1986). Se pueden observar ejemplos de este fenómeno en las fotografías de los geles desnaturalizantes realizados en esta investigación (Anexo 8.4. *Medidas, geles y gráficas de la RT-qPCR*).

Finalmente, las muestras de RNA se almacenaron, para una mejor conservación, en un congelador a -80°C .

3.3.3. Síntesis de cDNA

Para obtener las secuencias completas de cDNA que codifica para las proteínas MDR se usó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa o “PCR” y una variación de esta, conocida como RACE PCR *Rapid Amplification of cDNA Ends*, complementada por la *Nested PCR* o PCR anidada. Por esta causa, se han de sintetizar dos tipos de cDNA, uno para cada tipo de reacción.

Para las síntesis de cDNA por transcripción inversa, se utilizó el kit *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* de Invitrogen. La reacción se generó en un volumen final de 20 μl , que se obtiene en dos fases. Se partió de 2 μg RNA + 1 μl de hexámeros aleatorios + 1 μl dNTP 10 mM + agua, hasta completar los 10 μl . Esto se puso cinco minutos a 65°C y un minuto en hielo, mientras que, por otro lado, se mezcló 2 μl 10X RT buffer + 4 μl MgCl_2 25 mM + 2 μl DTT 0,1 M + 1 μl *RNaseOUT* + 1 μl *SuperScript III RT*. Se unieron las dos preparaciones y la reacción se introdujo en el termociclador, con el siguiente programa: 10 minutos a 25°C , 50 minutos a 50°C y 5 minutos a 85°C . A continuación, se añadió 1 μl de RNase H y se incubó todo a 37°C durante veinte minutos. Una vez finalizado, el cDNA estaba listo para usar o almacenar a -20°C o -80°C .

Para completar la secuencia hacia los extremos 3' y 5', fue necesario sintetizar un cDNA específico. Para ello se usó el kit *SMARTer RACE cDNA Amplification Kit* (Clontech), siguiendo el protocolo del fabricante. Para hacer la síntesis, se

3. Materiales y métodos

emplearon unos oligonucleótidos modificados: *3'-CDS RACE primer-A*, para el cDNA que se usó en la posterior *RACE 3'*, y *5'-CDS RACE primer* para la *RACE 5'*. Son necesarios para que el *SMART II A Oligo* se ancle en el extremo 5' y, cuando actúe la transcriptasa inversa, también transcriba esa secuencia, que será complementaria del cebador usado en la reacción de *RACE PCR*, el UPM (*Universal Primer Mix*). Para la síntesis de cDNA para la *RACE 3'*, el fragmento para la hibridación del UPM está unido al extremo 3' del *3'-CDS RACE primer-A*, quedando libre a modo de cola, por lo que no es necesaria su transcripción (Anexo 8.1. *Esquemas de los protocolos*).

Dependiendo de la concentración de la solución de RNA, se partió de entre 1 y 3 μl . A la reacción se le añadió 1 μl del *3'-CDS primer-A* o del *5'-CDS RACE primer*; dependiendo de la cadena que quisieramos sintetizar. Para *RACE 5'* también se añadió 1 μl del *SMART II A oligo*. En caso necesario, la mezcla se completó llevándola a 5 μl con agua MiliQ estéril. Esta reacción se incubó a 70°C durante 2 minutos y, a continuación, se introdujo en hielo durante otros 2 minutos.

En otro tubo, se preparó una segunda mezcla compuesta por 1 μl de *dNTP mix* (10 mM de cada uno), 1 μl de DTT (20 mM), 2 μl de *5x First Strand Buffer* y 1 μl de transcriptasa inversa. Esto se añadió a la reacción que se preparó previamente y se incubó a 42°C durante hora y media en el termociclador. La reacción obtenida se diluyó en 25 μl de tampón tricina-EDTA y finalmente se mantuvo durante 7 minutos a 72°C. El cDNA que se obtuvo ya servía para ser utilizado o conservado en un congelador de -20°C o -80°C.

3.3.4. Diseño de cebadores

Para confirmar la presencia del cDNA que codifica para la proteína MDR en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, se preparó una reacción inicial donde se usaron los cebadores diseñados por Franzelliti & Fabri en 2006. Se esperaba obtener un fragmento de un tamaño aproximado de 381 pb y, partiendo de esta secuencia inicial, se diseñaron nuevos cebadores para dirigirse hacia los

3. Materiales y métodos

extremos de la proteína y tratar de obtener su secuencia completa por reacciones de *RACE PCR*.

A partir de los fragmentos obtenidos y comparándolos con las bases de datos, una nueva secuencia parcial de una proteína MDR en *M. galloprovincialis* fue hallada con número de acceso ABO36618. Partiendo de ella y con el diseño de nuevos cebadores, se trató de amplificar la cadena completa de cDNA de la nueva ABCB, que designaremos como *mdr2*.

Para obtener la secuencia completa, hicieron falta reacciones de *RACE PCR*, para avanzar hacia los extremos, y PCRs normales para obtener más clones, con el fin de confirmar y hacer más robustos algunos fragmentos. Se ha de tener en cuenta que, para el diseño de oligos, los de *RACE* tienen características diferentes a los de las PCRs convencionales. Los de *RACE* son más grandes, de 23 a 28 nucleótidos (mientras que los de PCR estarán entre 18 y 24), por lo que, al ser mayores, la temperatura de fusión suele ser más elevada. En general, en el extremo 3', el nucleótido presente debería ser G o C (*GC clamp*) y no presentar más de 3 guaninas o citosinas en las 5 últimas posiciones. Además, no han de formar homodímeros con él mismo, ni heterodímeros con los otros cebadores que pueda haber en la reacción.

Para el diseño de los cebadores y comprobar que cumplían las características anteriormente citadas, se usó el programa, <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>, (OligoAnalyzer 3.1), con las siguientes condiciones para realizar los cálculos: oligos = 0,2 μ M; $[\text{Na}^+] = 50$ mM; $[\text{Mg}^{+2}] = 3,5$ mM; dNTPs = 0,8 mM. También se utilizó la herramienta bioinformática Primer3Plus, que sirve para facilitar la localización de cebadores con determinadas características dentro de la secuencia (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>).

Los cebadores elegidos para obtener las secuencias de las proteínas MDR fueron sintetizados por la empresa Thermo (Alemania). El nombre designado, la secuencia, el tipo de reacción para el que se utilizaron, el tamaño del frag-

3. Materiales y métodos

mento obtenido y la temperatura de anillado empleado, se pueden consultar en las Tablas 4a (*mdr1*), a continuación, y 4b (*mdr2*), en la página siguiente:

Tabla 4a. Oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR de *mdr1* en *Mytilus galloprovincialis*.

Nombre	Cebador 5'-3'	Objetivo	Amplicon	T ^a de anillado en la PCR
MDR1F	CAGAGGTTCTATGACCCAGATGCAG	Amplificación PCR	381 pb	54,5°C
MDR1R	GTTCTCACTCTCAGAGTCTAATGCAG			
MDR1F2	CCATTGCCAGAGCTTTGATYAGAGACCC	3'Race PCR	1067 pb	65°C
MDR1R2	CTGYCCTCCYGATAACTGAGCTCCAYGC	5'Race PCR	1830 pb	65°C
MDRMgFw	GTAGCAGCCCTGGTTATAGC	3'Race PCR	1463 pb	64,9°C
MDR End Nested3'	GTAGAAAGTGGTACACACCAGACTC	3'Race PCR	217 pb	65°C

3.3.5. Obtención de fragmentos de cDNA que codifican para proteínas MDR, por PCR y “rapid amplification of cDNA ends” o RACE PCR

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es un método desarrollado por el Dr. Kary Mullis en 1983. Permite la amplificación exponencial de secuencias a partir de una molécula de DNA (Mullis, 1990). La PCR implica la utilización de un par de cebadores, cada uno de unos 20 nucleótidos de longitud, que son complementarios a una secuencia definida en cada hebra del DNA. Estos cebadores se extienden por la acción de una DNA polimerasa, de modo que se hace una copia de la secuencia designada.

Después de hacer esta copia, los mismos cebadores vuelven a ser utilizados, no solo para hacer otra copia de la cadena de DNA de entrada, sino también de la copia que hizo en la primera ronda de la síntesis, conduciendo así a una amplificación exponencial.

La mezcla de PCR que se preparó incluía: una polimerasa termoestable, como la Taq polimerasa; cebadores específicos para el gen de interés; desoxinucleó-

3. Materiales y métodos

Tabla 4b. Oligonucleótidos específicos para la amplificación por PCR de *mdr2* en *Mytilus galloprovincialis*.

Nombre	Cebador 5'-3'	Objetivo	Amplicon	Tª de anillado en la PCR
MDR2 Start Rc3F	TGCCAGAACCAGAATTATTGGGAT	Amplificación PCR con qRt Rv	1290 bp	50-56°C
MDR2 Race3' Fw 1	AAGAAAGGGAGAAGAGGAAAGAAAAGGA	3'Race PCR/ Amplificación PCR con Rv1&Rv2	850 bp/1161-1249 bp	65°C/55°C
MDR2 Race3' Fw 2	TCGTTATAACGCTCCTGAATGGCC	3'Race PCR	475 bp	65°C
MDR2 Race3' Fw 3	TGGTTGGATGTATTGCTGCATGTTTGA	Amplificación PCR con Rv1&Rv2	1070-1158 bp	55°C
MDR2 Race3' Fw 4	GTGTTGGAGCTATGGCTTTAGGACA	Amplificación PCR con Ultimo2 Rv	1117 bp	58°C
MDR2 qRT Fw	GAGCCAAACTGGTAAGAGAGG	3'Race PCR	1082 bp	65°C
MDR2 qRT Rv	GTGGTGGAGCAACATTACCA	Amplificación PCR con Start Rc3' F		50-56 °C
MDR2 Fr Fw	TGGTGAGAGAGGAGCCCAGC	Amplificación PCR	640 bp	58°C
MDR2 Fr Rv	AAATGCTGGCTGAACCTCCAC			
MDR2 Rv1	TGCCAGTGTCTGTCCCTGGATC	Amplificación PCR con Race3' Fw 1 & Fw 4		55°C
MDR2 Rv2	GGCAGGATCTGTGTTGCTTG	Amplificación PCR con Race3' Fw 1 & Fw 4		55°C
MDR2 Ultimo2 Rv	GCAC TTACAATACACAGCAC	Amplificación PCR con Race Fw 4		65°C
MDR2 Fin R3'F	AGCTGTAGGAACGGCTAACATTTCATG	3'Race PCR	591 bp	65°C

3. Materiales y métodos

tidos trifosfato y un tampón adecuado. El cDNA se desnaturaliza alrededor de los 94°C, de modo que las dos hebras se separan. A continuación, la muestra se enfría entre 50 y 60°C, aproximadamente, y los cebadores específicos son unidos por complementariedad a un sitio en cada hebra. Luego, se eleva la temperatura a 72°C y la polimerasa termoestable Taq extiende el DNA entre los cebadores.

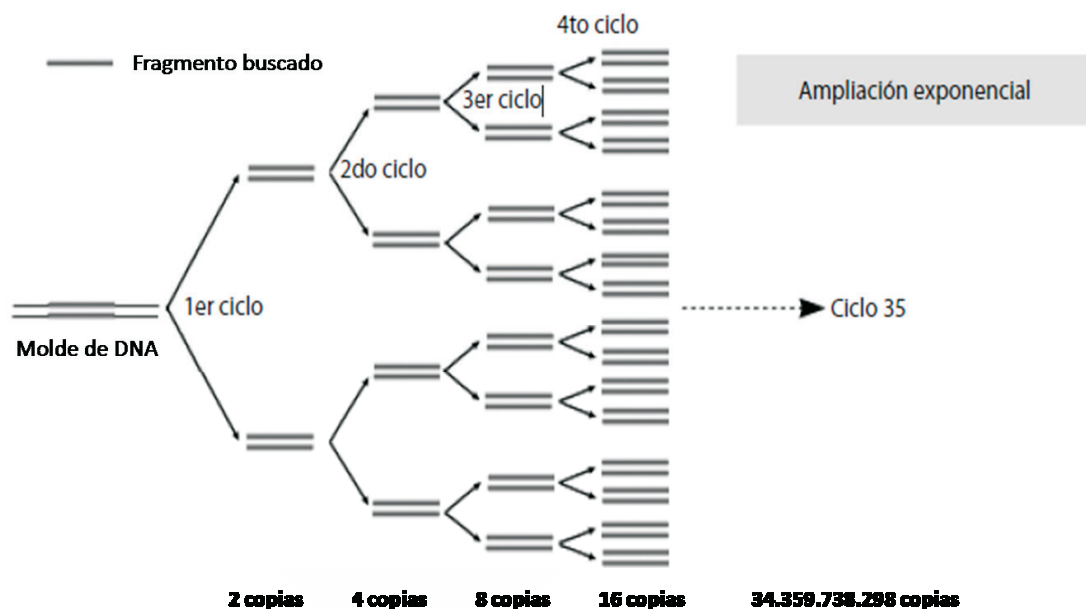


Figura 23. Estrategia de amplificación por PCR, los fragmentos se amplifican de forma exponencial (modificado a partir de Vierstraete, 2001).

El DNA complementario obtenido se usó como molde para la amplificación de los distintos fragmentos esperados, según los cebadores usados. Las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 50 μl que contenía 2 μl cDNA (de alrededor de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) + 1 μl de cada uno de los cebadores empleados a una concentración final 0,2 μM , a los que se añadió una mezcla de 1 μl dNTP (10 mM cada uno) + 5 μl 10X *HotMaster™Taq Buffer* + 0,2 μl (1 unidad) *HotMasterTaq DNA Polymerase (Eppendorf)* + 39 μl de agua. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Biometra con una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, seguidos de 35 ciclos con una desnaturalización a 94°C de 30 s, un anillado (unión de los cebadores a la secuencia) de otros 30 s, con una temperatura variable según el

3. Materiales y métodos

cebador que se use (T^a indicada en la Tabla 4) y una extensión a 72°C , cuya duración dependía del tamaño esperado de cada fragmento (1 minuto por cada kilobase). Se hizo un último paso de extensión a 72°C durante 2 minutos. En algunas ocasiones, fue necesario utilizar más ciclos de PCR para conseguir mayor cantidad de producto y que fuesen visibles en los geles de agarosa.

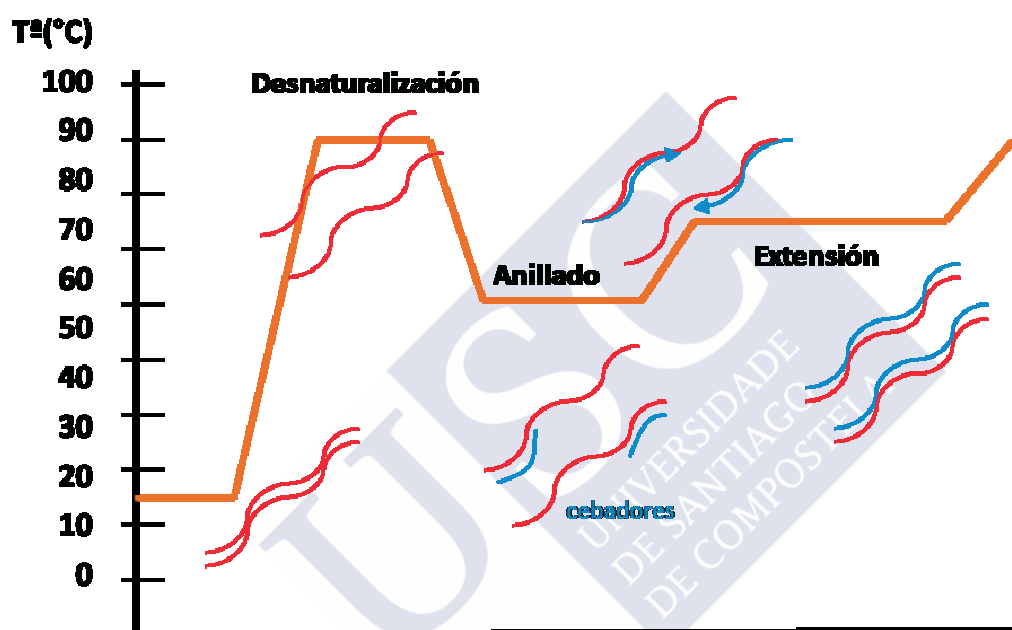


Figura 24. Proceso de amplificación en cada ciclo de PCR.

Partiendo de los fragmentos iniciales obtenidos de los cDNA que codifican para las proteínas MDR1 y MDR2, se obtuvo la secuencia completa mediante *RACE PCR* en sentido 3' y 5', usando el kit *SMARTer RACE cDNA Amplification* (Clontech). Para estas reacciones, en cualquiera de los sentidos, se utilizan los mismos compuestos. Solo se ha de cambiar el cDNA que se ha obtenido específicamente para cada sentido y los cebadores específicos apropiados para cada caso.

Se preparó la siguiente mezcla: 2,5 μl de cDNA 3' o 5' (aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) + 5 μl del cebador + 41,5 μl de Mix compuesto por 34,5 μl de agua milliQ + 5 μl de 10X Advance PCR Buffer + 1 μl de dNTP mix (10 mM) + 1 μl de 50X polimerase mix. La amplificación se realizó en un termociclador Biometra, de forma similar a la PCR convencional. El programa que se utilizó fue el

3. Materiales y métodos

siguiente: 2 minutos a 94°C, seguidos por 35 ciclos de amplificación, con una desnaturalización de 94°C x 30 s, una temperatura de anillado que variaba entre 55-65°C durante 30 s, dependiendo del cebador empleado, y la extensión igual a la usada en la PCR convencional. Se hizo una extensión final de 72°C durante 3 minutos.

En algunas ocasiones, el resultado obtenido en la *RACE PCR* no era el esperado, obteniéndose productos que, tras correrlos en la electroforesis, se observaban en el gel de agarosa más bandas de las deseadas o bandas difuminadas dando un *smear*. Para resolver esto y con el fin de aumentar la sensibilidad de las reacciones, se utilizó la PCR anidada o *Nested PCR*. Se basa en realizar una primera reacción de amplificación y, sobre el producto obtenido, se utilizan unos cebadores más internos; es decir, que estén localizados en la secuencia del fragmento que amplificamos en un inicio. El cebador más interno, para el UPM, será el NUP.

En todas las reacciones de PCR se hicieron controles, uno de ellos sin cDNA, para comprobar que no existían contaminaciones externas y, por lo tanto, no se debería de originar ningún producto. También se hicieron controles usando solo uno de los cebadores, para ver si podía provocar la amplificación de algún producto, lo que valdría para descartarlo en la reacción principal.

3.3.6. Electroforesis de los productos de amplificación y purificación de las bandas obtenidas

Después de los ciclos de síntesis de cDNA, los productos de reacción fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, tiñéndolos con bromuro de etidio. El equipo de electroforesis se puede observar en la fotografía de la página siguiente.

Para realizar la carga en los pocillos del gel, las muestras se mezclaron previamente con un tampón de carga en relación 1:10. Para la electroforesis, se ha de procurar no sobrepasar los 5V de voltaje por centímetro de distancia entre el cátodo y el ánodo, con el fin de evitar que el DNA se desnaturalice por un

3. Materiales y métodos

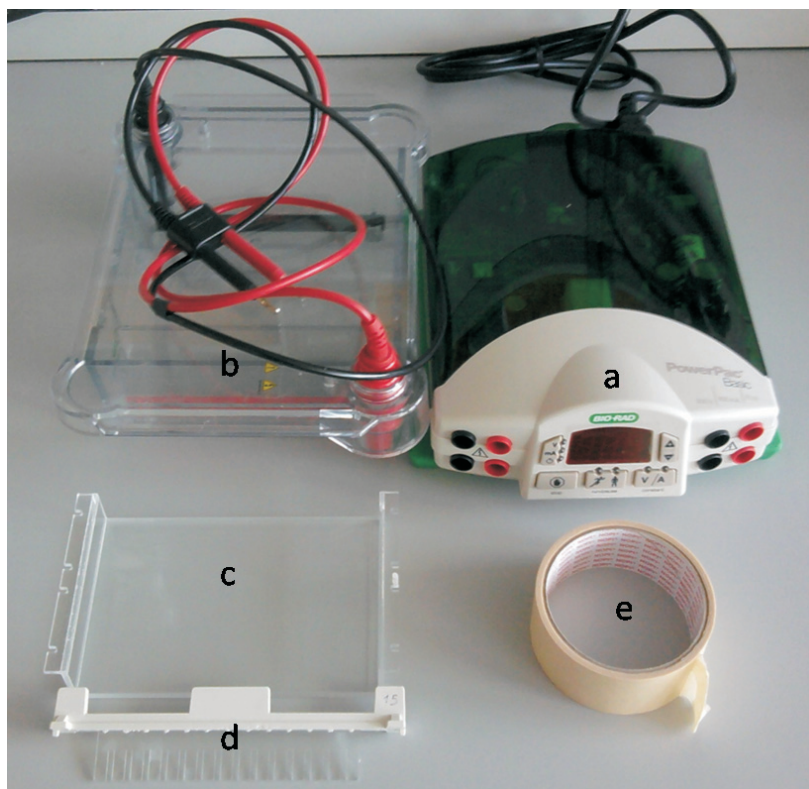


Figura 25. Equipo de electroforesis: a) fuente de alimentación; b) cubeta; c) bandeja; d) peine; e) cinta para cerrar la bandeja y hacer el gel de agarosa.

calentamiento excesivo. Se usan distintos marcadores moleculares para calcular el tamaño de los fragmentos, debido a que muestran un patrón de bandas de tamaños conocidos, como se puede ver en la Figura 26, de la página siguiente.

Los fragmentos de PCR esperados fueron cortados con una cuchilla, mientras se observaban con un transiluminador de luz ultravioleta, con la debida protección de unas gafas de metacrilato, bata y guantes. El bromuro de etidio es un agente intercalante, que tiene una alta afinidad para unirse a los ácidos nucleicos de doble cadena, y bajo luz ultravioleta es excitado, lo que permite que los fragmentos obtenidos se vean a simple vista.

También se pudo fotografiar el gel mediante una cámara conectada a un ordenador con el software apropiado (*Image Reader LAS-3000 V2.2. Fujifilm*), con el fin de observar el patrón de bandas obtenidas y poder conservar la imagen.

3. Materiales y métodos

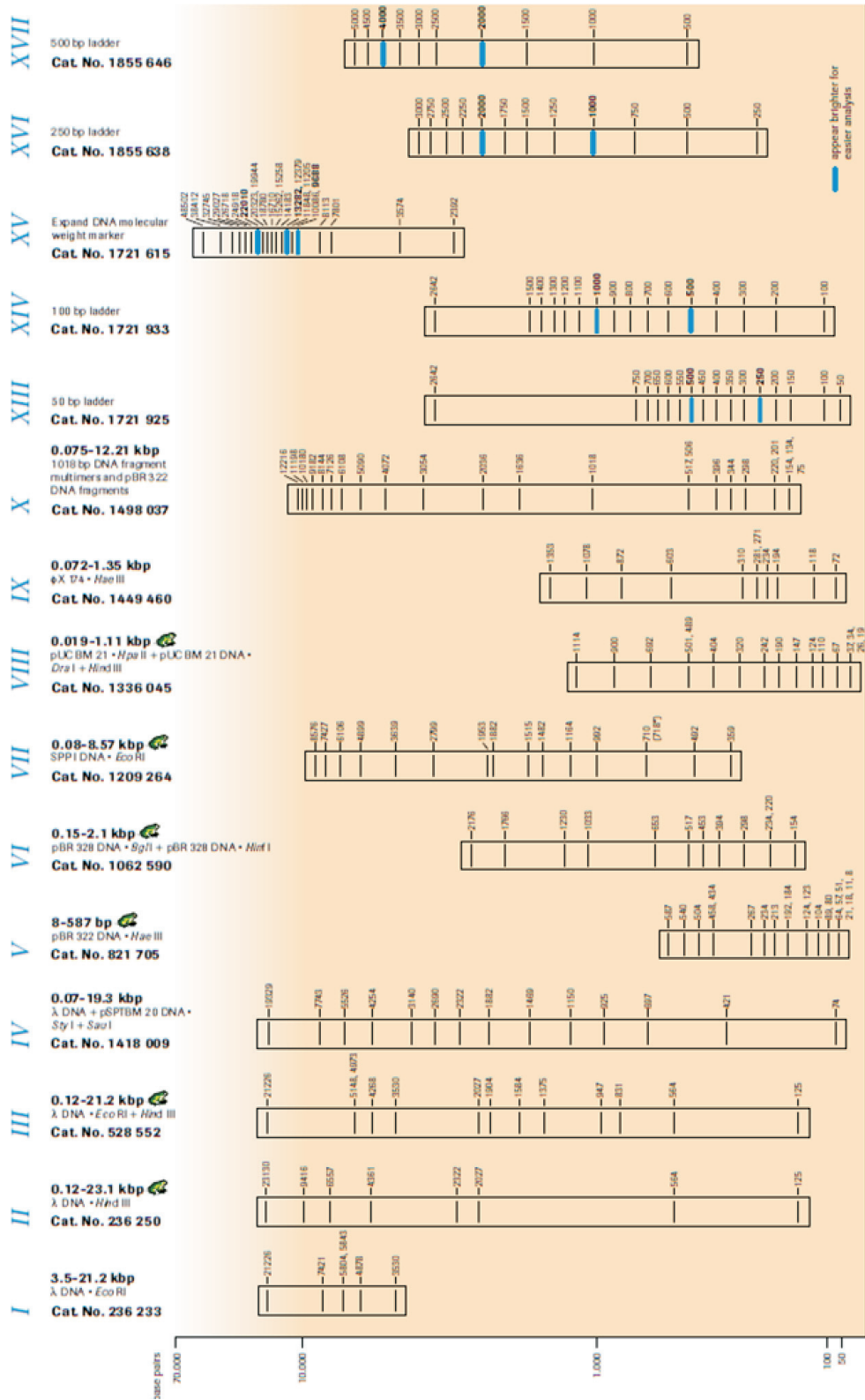


Figura 26. Ejemplo de marcadores moleculares con distintos patrones. (Obtenido de Roche: <https://www.roche-applied-science.com/isis/clo-ning/index.jsp?id=010500>)

3. Materiales y métodos



Figura 27. A) Transiluminador para ver los geles de agarosa con luz ultravioleta. B) Analizador de imágenes LAS-3000 V2.2. Cámara acoplada a un ordenador, con un software para hacer fotografías de los geles.

Este tipo de gel de agarosa, para el análisis de los productos obtenidos, no permite la cuantificación exacta, puesto que el bromuro de etidio es poco sensible y cuando una banda es detectable, generalmente la fase exponencial de amplificación ya ha sido alcanzada.

Para separar y purificar el DNA del gel de agarosa, se usó el kit comercial *Nucleo Spin Extract II*. Antes de nada, se pesaron las bandas que se cortaron y, según la concentración a la que se preparó el gel de agarosa, se añadió el tampón QG (200 μ l de buffer NT por cada 100 mg de gel al 1 %; si fuera al 2 %, duplicaríamos el volumen de tampón). A continuación, la mezcla se introdujo en la incubadora durante 10 minutos a 50°C, con agitación, para favorecer la total disolución del gel. Se pasó el contenido del tubo a una columna con tubo colector, mediante una centrifugación a 11.000 g durante 1 minuto. La mezcla atravesó la membrana de la columna, a la que el DNA debería de unirse por afinidad.

Se descartó el sobrenadante y la columna se volvió a colocar en el mismo tubo colector, para hacer un lavado con 700 μ l del tampón NT3 (al que se le añadió etanol previamente) y una posterior centrifugación de 11.000 g durante un

3. Materiales y métodos

minuto. Se volvió a centrifugar otros dos minutos, para un buen secado de la membrana, y a continuación se pasaron las columnas a tubos *Eppendorf* limpios, a los que se les añadió 15 μ l de agua MiliQ estéril o de “Buffer NE” (5 mM Tris/HCl, pH 5) sobre la membrana, la cual quedó actuando un minuto, ya que estos líquidos rompen por cambio de pH los enlaces que había entre el DNA y el filtro. Tras una nueva centrifugación, se recogió la disolución con el DNA, repitiéndose la operación con otros 10 μ l, para obtener un volumen suficiente. La concentración y pureza se midieron por espectrofotometría UV con el *Nanodrop 1000 spectrophotometer*, esperando ver un solo pico en el cromatograma, que correspondería a un solo producto (Figura 22). La disolución ya podría ser utilizada o conservada a -20°C para su posterior uso.

3.3.7. Clonación de los productos de PCR purificados

A partir del producto de PCR purificado del gel de agarosa, se llevó a cabo la clonación del fragmento. Se comenzó con una reacción de ligación entre el vector y el inserto, con el kit *pGEM[®]-T Easy Vector System* (Promega). La reacción constaba de 5 μ l 2x *Rapid ligation buffer* + 1 μ l pGEM-T easy vector + 1 μ l Enzima T4 DNA ligasa + hasta 3 μ l de producto de PCR a ligar + agua MiliQ estéril hasta alcanzar los 10 μ l. Se mezclaron bien todos los reactivos y se dejaron a 4°C en una nevera incubando toda la noche para obtener el rendimiento máximo de ligación.

Al día siguiente, se realizó la transformación de células competentes de *Escherichia coli* de la cepa JM109, con las muestras de plásmido con el inserto ligado. El objetivo era introducir el plásmido con el inserto en un organismo hospedador con capacidad de replicarlo, para obtener un elevado número de copias del fragmento.

Para ello, se partieron de 2 μ l de cada reacción de ligación, que se depositaron en tubos de ensayo de poliestireno estériles y se mantuvieron en hielo. A su vez, se descongelaron lentamente las células competentes (que se conservaban congeladas a -80°C) y se transfirieron 50 μ l a cada tubo. Se mezclaron suavemente y se dejaron en hielo durante 30 minutos. A continuación, se aplicó

3. Materiales y métodos

un shock térmico, introduciéndolas en un baño de agua a 42°C durante 60 s, y se volvieron a poner de nuevo en el hielo dos minutos.

En este punto, las células ya se transformaron, incorporando los productos de ligación. Entonces se añadió 1 ml de medio SOC y se incubó durante 60-90 minutos a 37°C con una agitación de 200 revoluciones por minuto. Esto se hace para favorecer el desarrollo de más bacterias y que con el movimiento se evita que se depositen unas sobre otras, lo que crearía condiciones de anoxia y la muerte de algunas colonias.

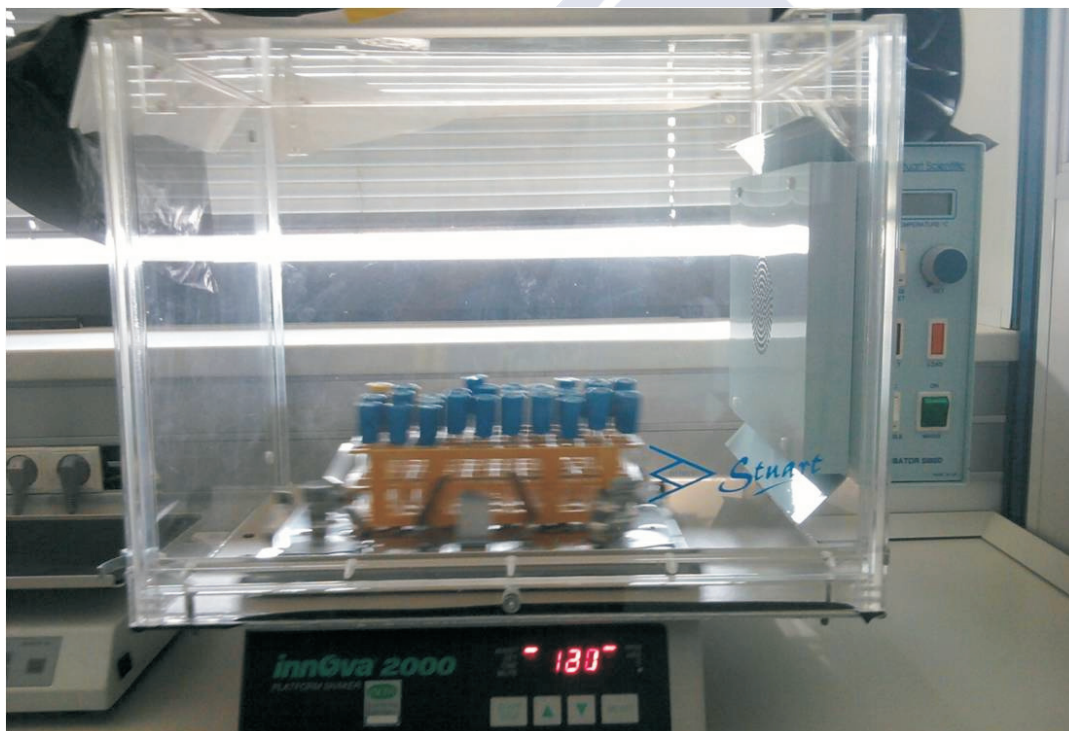


Figura 28. Incubadora con agitador para el cultivo y crecimiento de bacterias recombinantes.

Mientras van aumentando el número de bacterias, se prepararon dos placas Petri con medio LB + ampicilina por cada reacción de ligación que se iban a hacer. A estas se les añadió una mezcla de 62,5 µl de X-Gal al 2% y 12,5 µl de IPTG 100 mM, que se repartió bien por toda la placa con un asa de siembra y se dejó secar durante 30 minutos a 37°C.

3. Materiales y métodos

La solución con las células cultivadas en SOC, contenidas en los tubos de ensayo de plástico, se concentró, centrifugándolas a 1.000 g durante 10 minutos, y se retiraron alrededor de 900 µl del medio de cultivo. El producto restante se resuspendió suavemente con unos 200 µl de SOC nuevo. Esto fue repartido en las placas de LB + ampicilina + IPTG + X-Gal, aproximadamente 100 µl de la solución de SOC con las bacterias transformadas, para tener duplicados de cada placa por si alguna salía mal. Las placas con el cultivo se incubaron toda la noche a 37°C.

Al día siguiente, se pudo observar el crecimiento de distintas colonias, debido a las características del vector de clonación. Se pueden distinguir las bacterias transformadas, que poseen el inserto, de aquellas que no lo han hecho. Las colonias que no contienen el inserto se ven de color azul, mientras que las colonias de color blanco han integrado correctamente el fragmento (véase la Figura 29).

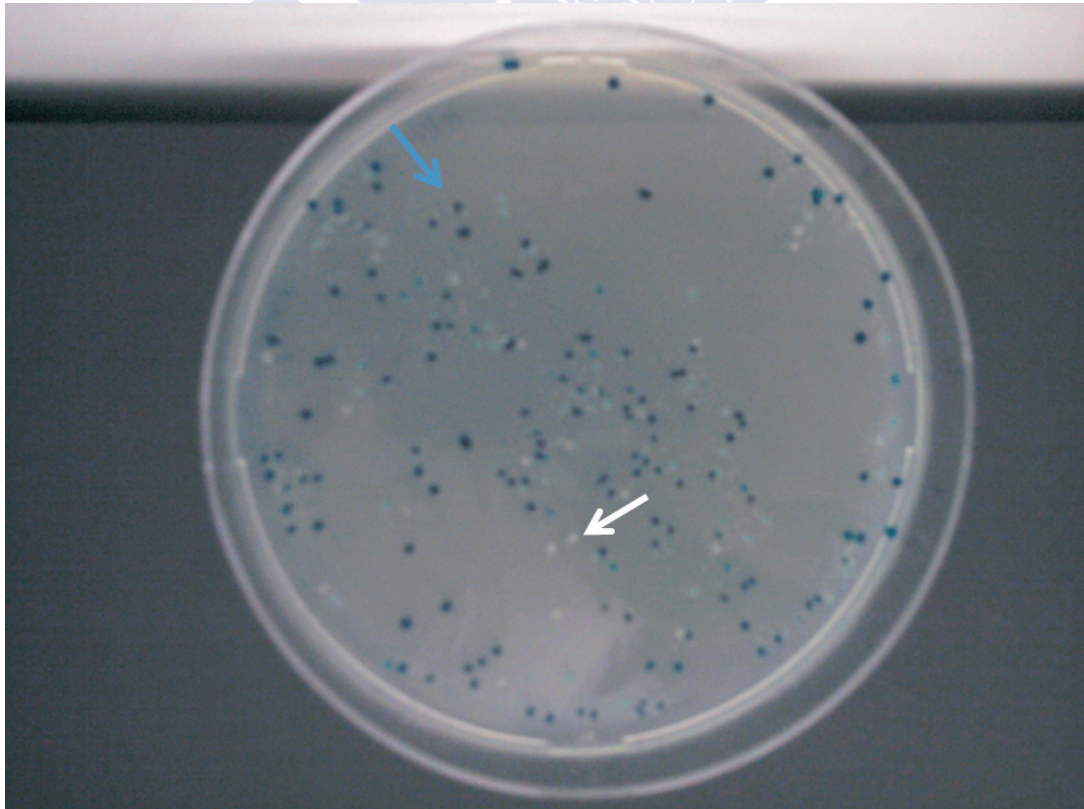


Figura 29. Placa de cultivo de LB con ampicilina, IPTG y X-Gal, para realizar una determinación de las colonias con el inserto (blancas), frente a las que no lo tienen (azules).

3. Materiales y métodos

Esto es debido a los reactivos que se usaron en la placa de LB. El objetivo es discriminar entre aquellas colonias con actividad β -galactosidasa. El IPTG se usa para inducir la expresión del gen *LacZ* (que cataliza la reacción de hidrólisis de la lactosa), mientras que el X-gal es un análogo de la lactosa, por lo que sirve de sustrato para la β -galactosidasa, de modo que, al ser hidrolizado, forma precipitados azules. El vector *pGEM[®]-T Easy* presenta el gen *LacZ* y la ligación de los insertos se produce a este nivel del vector (Figura 30). Las colonias azules corresponden a células transformadas con el vector, pero sin el inserto. Por eso presentan el gen de la β -galactosidasa funcional y, por tanto, que metaboliza los sustratos X-Gal e IPTG, dando lugar a un precipitado de color azul. Si la ligación sale correctamente y hay inserción del fragmento de DNA dentro del plásmido, el gen de la β -galactosidasa no es funcional, por lo que las colonias serán blancas.

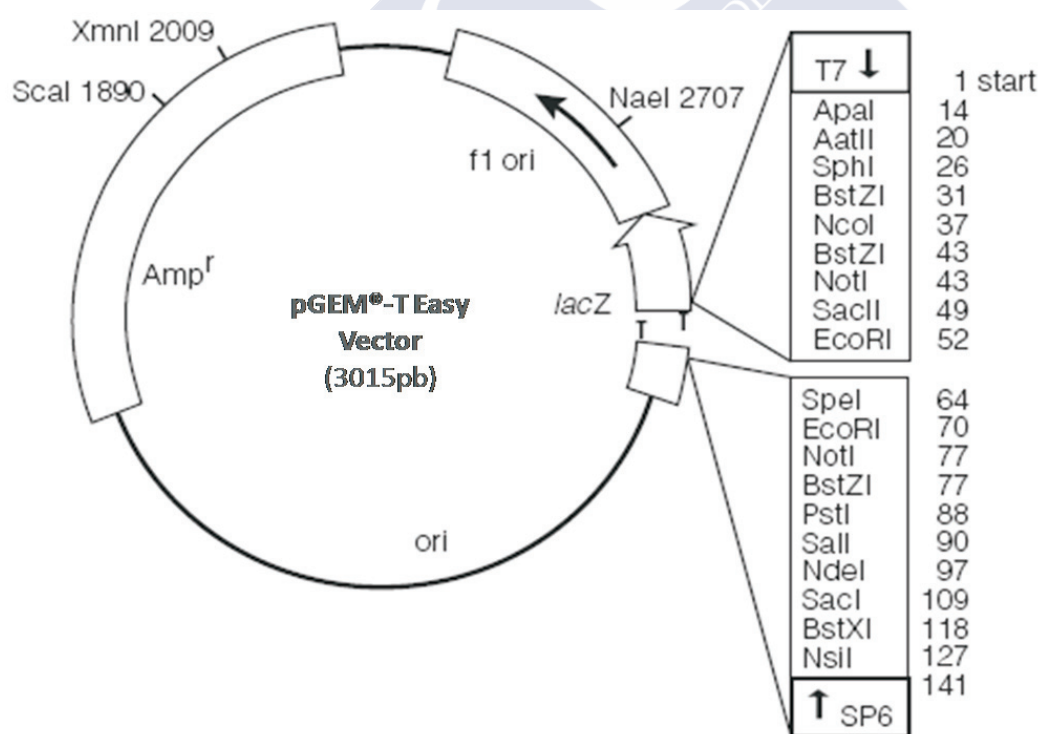


Figura 30: Mapa del Vector *pGEM[®]-T Easy*. Ori: origen de replicación; *Amp^r*: gen de resistencia a la ampicilina; *lacZ*: gen que cataliza la actividad β -galactosidasa; y un sitio de multiclonaje con varias dianas de restricción para diferentes enzimas (Promega Corporation).

A continuación, se aislaron algunas colonias que en principio contenían el inserto. Para ello, se seleccionaron aquellas de interés, recogiendo con un pa-

3. Materiales y métodos

lillo estéril para sembrarlas en medio LB líquido con ampicilina. Previamente, se prepararon unos tubos de ensayo de cristal esterilizados con 3 ml del medio, a los que se les introdujo la colonia seleccionada, y se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, se comprobó si había crecimiento bacteriano en los cultivos, observando si los medios estaban más turbios.

3.3.8. Minipreps de las bacterias recombinantes

Partiendo de los cultivos en medio LB líquido de bacterias replicadas con el fragmento insertado, se procede a la recuperación del plásmido con el kit *GenElute™ Plasmid Miniprep* (Sigma). Este protocolo, utiliza el método de la lisis alcalina de las bacterias (que se basa en la precipitación diferencial de DNA plasmídico y genómico, tras su desnaturalización a alto pH) y una posterior adhesión del DNA a una membrana de sílice.

Lo primero que se hizo fue concentrar las bacterias que habían crecido mediante una centrifugación de 14.000 g durante 1 minuto. Para ello, se pasaron 1,5 ml a tubos *Eppendorf* para poder centrifugarlos y se recolectaron las células en el fondo, retirando el medio por aspiración con un sistema de vacío. Se repitió la acción para completar la precipitación del resto de bacterias que quedaban en el medio.

Las bacterias con el inserto fueron resuspendidas con 200 µl de solución de resuspensión y se homogeneizaron bien, usando el vortex. A continuación, se añadieron 200 µl de solución de lisis para romper la pared bacteriana. Antes de 5 minutos se hubo de añadir 350 µl de solución de neutralización, para evitar desnaturalizar el plásmido. Esta mezcla se centrifugó 10 minutos a 14.000 g, formándose un precipitado blanco con los restos, que fue descartado. El sobrenadante se pasó a unas columnas con filtro y se centrifugaron a 14.000 g durante 1 minuto. Se descartó el líquido y se añadieron en la columna 750 µl de solución de lavado, a la que previamente se le incorporó el etanol indicado, para realizar una nueva centrifugación. Se repitió la acción y se hizo una nueva centrifugación de 2 minutos, con el fin de eliminar el posible exceso de etanol.

3. Materiales y métodos

Finalmente, se pasó la columna a un tubo limpio y se añadieron 30 μl de agua MiliQ estéril o de tampón de elución, que, por cambio de pH, rompe los enlaces establecidos entre el DNA y el filtro. Con una nueva centrifugación, se recogió la solución en el fondo del tubo y se repitió la acción con 20 μl para recuperar el posible DNA que aún estuviera retenido. Se confirmó la pureza y concentración del DNA con el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Para que las muestras fuesen de buena calidad, la relación de las absorbancias obtenidas a longitudes de onda de 260/280 nm debía estar entre 1,7 y 1,9.

Los restos que habían quedado del cultivo en LB líquido sirvieron para sembrar placas de LB con ampicilina y así conservar los clones obtenidos. Se mantuvieron en la estufa a 37°C hasta el día siguiente y, una vez crecieron las nuevas colonias, se conservaron las placas selladas con Parafilm en la nevera. Estos cultivos fueron replaqueados cada cierto tiempo para un buen mantenimiento de los clones.

3.3.9. Confirmación de la presencia de los insertos

Se pueden realizar dos pruebas diferentes para comprobar que los fragmentos han sido correctamente aislados: hacer una digestión enzimática con la endonucleasa de restricción EcoRI, o bien una PCR con los cebadores M13. Para la digestión, se aprovecha que el vector de clonación utilizado contiene varios sitios de reconocimiento para determinadas enzimas de restricción (Figura 30). Se preparó una mezcla con 1 μl de 10X Buffer H + 0,25 μl de la enzima *EcoRI* + de 1 a 2 μl de la muestra de DNA, según la concentración de la muestra + agua miliQ, hasta llegar a los 10 μl . La reacción se dejó 15 horas a 37°C y se inactivó llevándola a 65°C durante 15 minutos. A continuación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa, para ver si el tamaño de los insertos digeridos correspondía con el de los fragmentos clonados.

En el caso de la PCR con los M13, se aprovecha que, a ambos lados del lugar de inserción del fragmento clonado en el plásmido, se encuentra la secuencia del fago λ , que es complementaria de los cebadores M13 (M13 Fw:

3. Materiales y métodos

3'-GTTTTCCCAGTCACGAC- 5' y M13 Rv: 3'-GTCATAGCTGTTTCCTG- 5'). Por tanto, al hacer la PCR se consigue amplificar el fragmento comprendido entre estas dos regiones, con lo que, al hacer una electroforesis, se puede confirmar si el tamaño esperado es el correcto. La temperatura de anillado es la utilizada para los cebadores M13, de 60°C, mientras que los tiempos de extensión que se usan para el programa serán iguales a los empleados en la PCR con la que se obtuvieron los fragmentos. Finalmente, se comprobaron los resultados con una electroforesis.

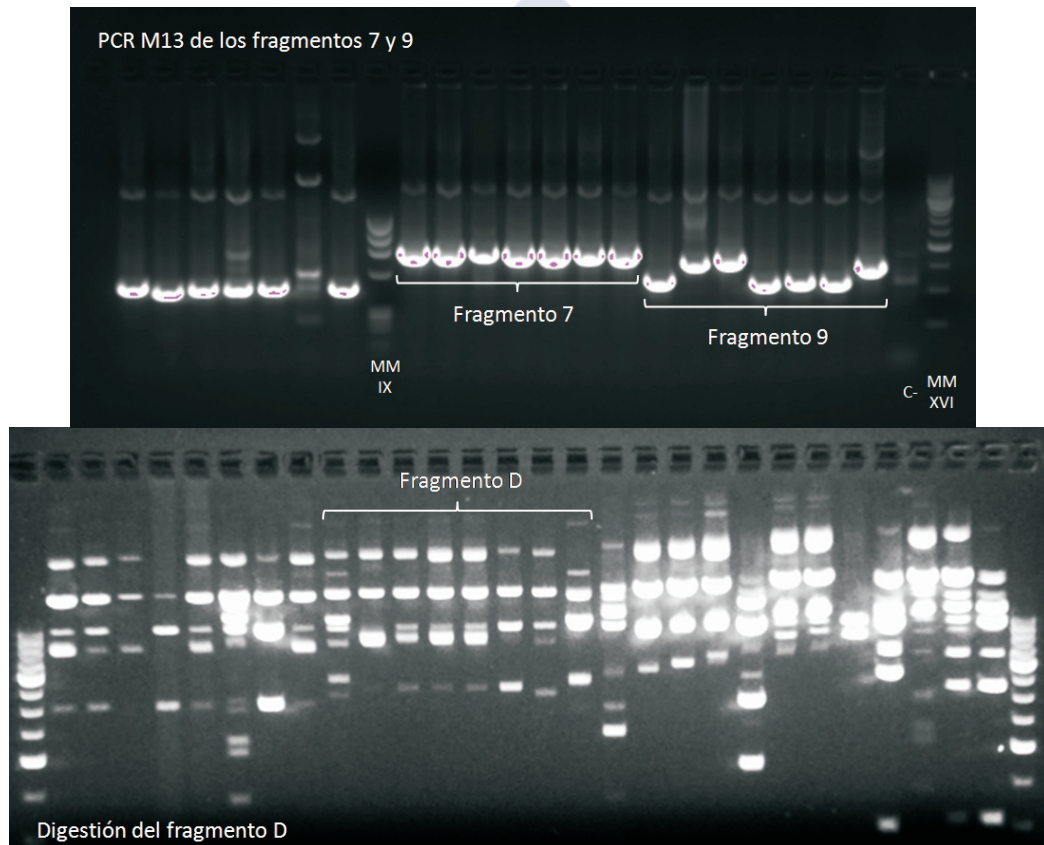


Figura 31: Geles para identificar los fragmentos esperados tras la clonación. En la PCR M13 se pueden observar las bandas de los fragmentos clonados, con un tamaño 200 pb mayor al inserto clonado, también se ven unas bandas más débiles y de mayor tamaño, correspondientes al plásmido. Para el fragmento 9 se puede distinguir, como algunos de los clones, no integraron correctamente el fragmento esperado, ya que se ven bandas de distinto tamaño al esperado. En la digestión se pueden ver distintas bandas, entre las que se han de diferenciar entre aquellas que corresponden al plásmido, de gran tamaño; y las de los clones, con el tamaño esperado.

En el gel de las digestiones enzimáticas, se pueden observar al menos dos bandas, una que corresponde al plásmido cortado de aproximadamente 3 kb y otra, al

3. Materiales y métodos

fragmento insertado. También puede ocurrir que se observen varias bandas de gran tamaño, correspondientes a distintas conformaciones del plásmido e incluso puede suceder que en el inserto haya un punto de corte interno para la enzima de restricción. En este caso, se originarían más bandas de las esperadas, donde la suma de sus tamaños debería ser igual a la del fragmento esperado.

Por otra parte, en los geles de la PCR M13, se ven las bandas de los fragmentos con un tamaño un poco mayor del esperado. El aumento de tamaño de las bandas se debe a que en la PCR se adiciona una secuencia de aproximadamente 200 nucleótidos al producto final, ya que el fragmento obtenido incluye parte del plásmido. Además, se pueden observar otras bandas, correspondientes al resto del plásmido. En la digestión, también se produce una adición de parte del plásmido, pero de solamente 20 nucleótidos, por lo que apenas es apreciable al visualizar el gel.

3.3.10. Stock en glicerol

Aquellos clones interesantes para guardar con destino a un uso futuro se almacenaron en una mezcla de medio de cultivo y glicerol. Las colonias elegidas se cultivaron en medio SOB toda la noche a 37°C, en agitación a 200 rpm, y se mezclaron a partes iguales en un tubo *Cop Nunc* con una solución de 60% de medio SOB y 40% glicerol. Estas muestras se conservaron con una congelación rápida con nitrógeno líquido y finalmente se almacenaron en un congelador a -80°C.

3.3.11. Secuenciación

Para comprobar la identidad de los fragmentos obtenidos, clonados y purificados, se enviaron a secuenciar a Secugen S.L, empresa biotecnológica dedicada a la secuenciación de DNA y al diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias. Se prepararon 15 µl de la muestra en un tubo *Eppendorf*, indicando el cebador y la temperatura que se usó para llevar a cabo la secuenciación. Una vez que estuvieron preparadas las muestras, se empaquetaron y se enviaron por mensajería. Al cabo de unos días, se pudieron consultar los resultados en

3. Materiales y métodos

la página web de la empresa, para confirmar si los fragmentos analizados correspondían con las secuencias nucleotídicas esperadas.

3.3.12. Análisis informático

Las secuencias recibidas fueron analizadas para comprobar si se habían conseguido buenos resultados. Para ello, fue necesario el uso de varios programas informáticos que nos ayudasen a corroborarlo. Primero, se abrieron los archivos descargados, que están en formato .abi, con el Finch TV version 1.4.0. Así se pudo ver la secuencia de nucleótidos y el cromatograma generado. Con el buscador que incorpora, se procuraron localizar los cebadores que se usaron o, en caso de no encontrarlos, los extremos del plásmido que están unidos a la secuencia. El cromatograma que se obtuvo, en algunos casos, no era muy claro y, por tanto, el nucleótido correspondiente no estaba designado. En ese caso se corrigió manualmente para conseguir una secuencia continua.

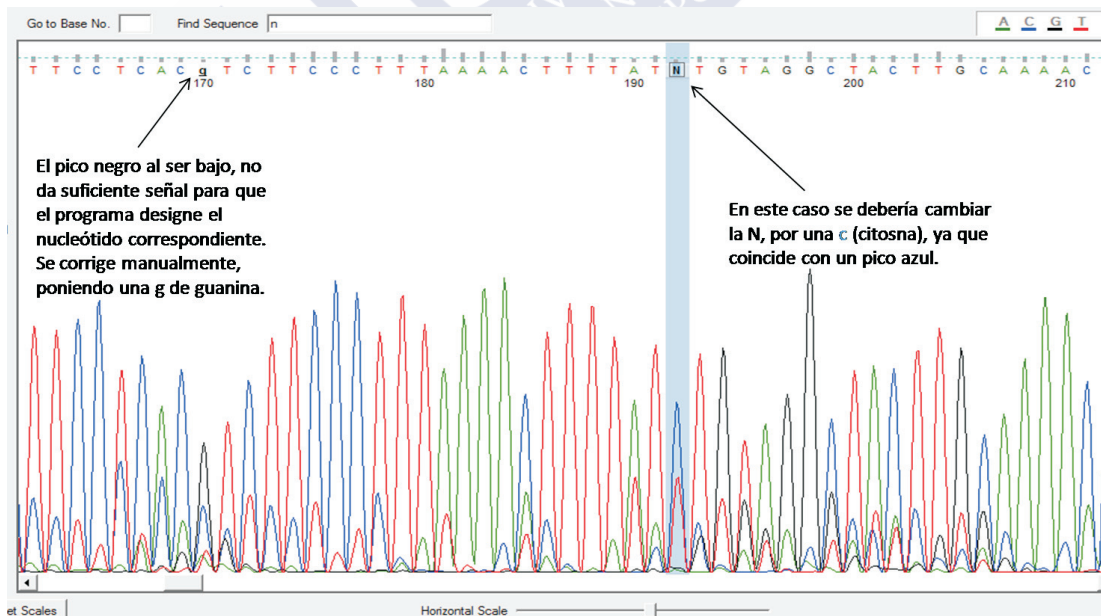


Figura 32: Las franjas grises situadas encima de los nucleótidos, indican la calidad de secuenciación. Si no alcanza la línea de puntos azul, significa que el pico del cromatograma no es específico y el programa no es capaz de distinguir el nucleótido correspondiente. El símbolo que se emplea en estas ocasiones es N, que se podrá modificar por el usuario, designando el nucleótido que se considere para cada situación. Se escribirá con minúsculas para facilitar su posterior localización.

3. Materiales y métodos

Una vez los fragmentos fueron analizados, se tradujo la secuencia de nucleótidos a las posibles pautas que se generan en aminoácidos, que serían seis posibilidades. Esto depende de que cada aminoácido está compuesto por un codón de tres nucleótidos y, dependiendo donde se empiece la lectura, el patrón variará. Además, también influye el sentido en el que se haga la lectura de la secuencia. Se usó el software *ORF Finder online tool (Open Reading Frame Finder; www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/)*, que identifica todos los marcos abiertos de lectura que estén presentes en la secuencia. Según la pauta obtenida, se pudo deducir cuál de ellas se ajustaba al patrón esperado.

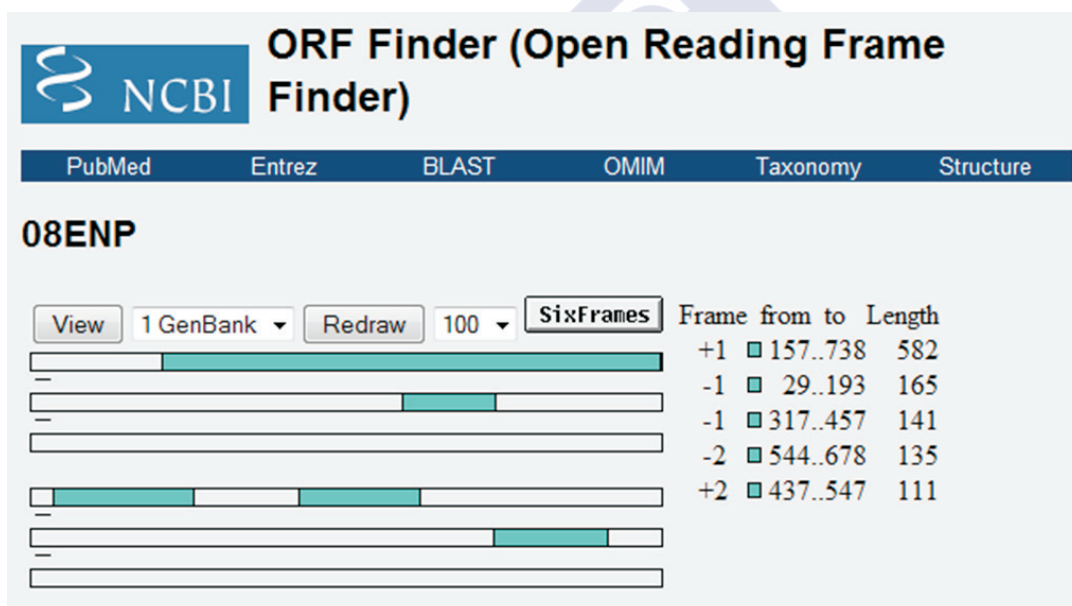


Figura 33: Ejemplo de funcionamiento del ORF Finder. A partir de la secuencia de nucleótido, el programa genera las seis secuencias aminoacídicas posibles. Las bandas azules representan campos abiertos de lectura; y cada línea vertical delimitando estas bandas, corresponde con un codón stop. También se indican los tamaños de los fragmentos obtenidos. En este caso, la primera posibilidad, parece que sería la más interesante para analizar.

A continuación, la secuencia de aminoácidos elegida pudo ser comparada con otras secuencias de proteínas depositadas en las bases de datos, usando los programas BLASTP (Altschul *et al.*, 1997) y FASTA (Pearson & Lipman, 1988). Con estos programas, se pudo analizar el grado de similitud que existía frente a otras secuencias de otras proteínas MDR en distintos organismos, presentes en las bases de datos de secuencias. Además, también existía la posibilidad de

3. Materiales y métodos

analizar la secuencia de nucleótidos, para compararlas con otras secuencias de DNA, devolviendo los resultados más similares.

Otro programa muy interesante, que nos permite generar un alineamiento múltiple de secuencias de DNA o de proteínas, es el CLUSTALW (Higgins *et al.*, 1994), que compara distintas secuencias y las alinea, considerando las identidades, las semejanzas y las diferencias. El alineamiento generado se trabaja con el programa GeneDoc 2.7.0, que ayuda a localizar las zonas conservadas, que se han mantenidos muy similares entre distintas especies.

Finalmente, los fragmentos fueron ensamblados, usando el programa CAP (contig assembly program) integrado en el software *BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3.*, con el que se ensamblaron todos los fragmentos obtenidos, para obtener la secuencia final de la proteína desde el extremo 5' hasta el lado 3'.

En este trabajo, se ha intentado obtener una cobertura en la secuenciación de al menos cinco clones. Ello es debido a que, para algunas posiciones nucleotídicas, se obtienen resultados variables, por lo que la presencia de varios clones nos permitió comparar y observar qué nucleótido era el más frecuente y, por tanto, el que fue elegido para la secuencia final.

Una vez se completaron las secuencias de los cDNA de los genes *mdr1* y *mdr2* en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), fueron enviadas a la base de datos EMBL Nucleotide Sequence Database, con número de acceso: *mdr1*, FM999809 y *mdr2*, HF912273.

3.3.13. Análisis filogenético

Con el objetivo de evaluar las relaciones de los dos transportadores ABCB identificados en el mejillón, frente a diferentes ABCB de varias especies, se llevó a cabo un análisis filogenético. Las secuencias aminoacídicas obtenidas fueron comparadas a otras encontradas en las principales bases de datos. Se obtuvo un árbol filogenético, empleando un servidor en línea (Phylogeny.fr), y

3. Materiales y métodos

con el programa informático MEGA versión 5. Se usaron ABCB completas de humano *Homo sapiens*, la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* y algunas especies de invertebrados marinos como mejillones *M. californianus* y *Brachidontes pharaonis*, las ostras *Crassostrea ariakensis* y *C. gigas*, la pulga de agua *Daphnia pulex*, la ascidia *Ciona intestinalis*, el caracol de mar *Lotia gigantea* y el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*. También se usaron ABCB del hemicordado *Saccoglossus kowalevski* y del nematodo *Caenorhabditis elegans*. Se usó una secuencia de *Trichoplax adherens* para enraizar el árbol.

Primero se introdujeron las secuencias elegidas en Phylogeny.fr, que es un servicio web para el análisis de las relaciones filogenéticas entre secuencias. Utiliza una serie de programas en línea, donde se puede generar el flujo de trabajo para realizar la filogenia. Para este análisis de aminoácidos, se realizó la alineación de secuencias utilizando MUSCLE 3.7. A continuación, se seleccionaron las zonas más conservadas del alineamiento (*curation*), que fueron las empleadas para hacer la filogenia, realizada con Gblocks y de baja rigurosidad. Después, se llevó a cabo un análisis de máxima verosimilitud, con PhyML, para determinar los valores de las ramas originadas. Por último, el árbol filogenético fue diseñado con el programa TreeDyn 198.3.

Los resultados del alineamiento y la posterior *curation* fueron utilizados para transformarlos a un archivo que pudiese leer el MEGA y, así, poder hacer otros análisis moleculares relacionados con la filogenia, ya que este programa proporciona herramientas para explorar y analizar las secuencias con aspectos evolutivos, generando distintos árboles según los diferentes métodos de análisis que sean empleados (Anexo 8.2. *Árboles filogenéticos*).

3.4. Expresión

3.4.1. Introducción

La RT-qPCR (transcripción inversa, seguida de PCR en tiempo real cuantitativa) es una técnica rápida y extremadamente sensible, precisa y fácil de reproducir, que sirve para medir los niveles de mRNA y cuantificar la expresión de

3. Materiales y métodos

genes (Bustin, 2000, 2002; Huggett *et al.*, 2005, Kubista *et al.*, 2006). En los últimos años se está convirtiendo en una herramienta muy popular para realizar estudios de toxicología. Algunos autores la han empleado en sus investigaciones, para examinar diferentes situaciones patológicas y toxicológicas en los moluscos (Dondero *et al.*, 2005; Araya *et al.*, 2008; Siah *et al.*, 2008; Morga, 2010; Wan *et al.*, 2011).

Lo revolucionario de esta técnica es que se detecta el progreso de la reacción de PCR tal y como va transcurriendo. Los datos se van recogiendo a lo largo de todo el proceso y no solamente al final de la reacción, como pasa en la PCR convencional. Para ello, la cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoróforos en la reacción de PCR, que se unen al fragmento que se amplifica de forma cuantitativa. La cantidad de la fluorescencia producida en cada ciclo de PCR es cuantificada y recogida por el iCycler.

El equipo de PCR, en tiempo real, está conectado a una computadora con un programa necesario para manipular el termociclador. En esta investigación se utiliza el iCycler iQ™ (BioRad). El termociclador contiene una cámara sensible que cuantifica la fluorescencia en cada pocillo de la placa, a intervalos frecuentes durante la reacción de PCR.

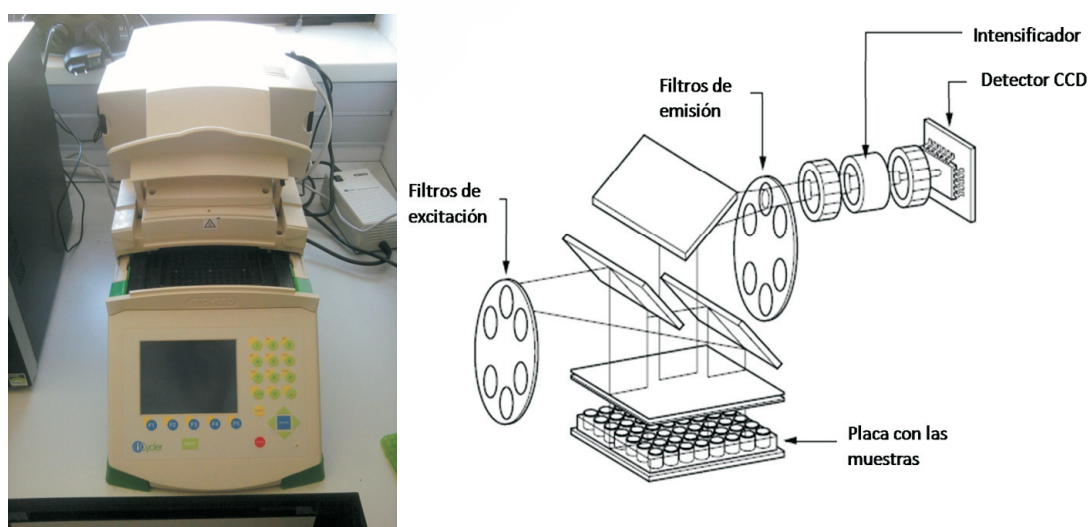


Figura 34: iCycler y representación de la disposición del sistema de detección óptica (extraído de *iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System Instruction Manual*).

3. Materiales y métodos

A medida que se sintetiza nuevo DNA, más fluoróforo se unirá a él y la fluorescencia se incrementará. El marcador fluorescente que utilizamos (*Eva Green*, de última generación, similar al *SYBR Green*) es intercalante, es decir, se une a toda doble hebra de DNA, independientemente de su secuencia (por lo tanto, a todas las secuencias de doble cadena formadas en la reacción), emitiendo fluorescencia tras ser excitado por una longitud de onda adecuada. Una vez que el colorante se une a los fragmentos sintetizados, este emite una señal fluorescente que es procesada en tiempo real (Walker, 2002).

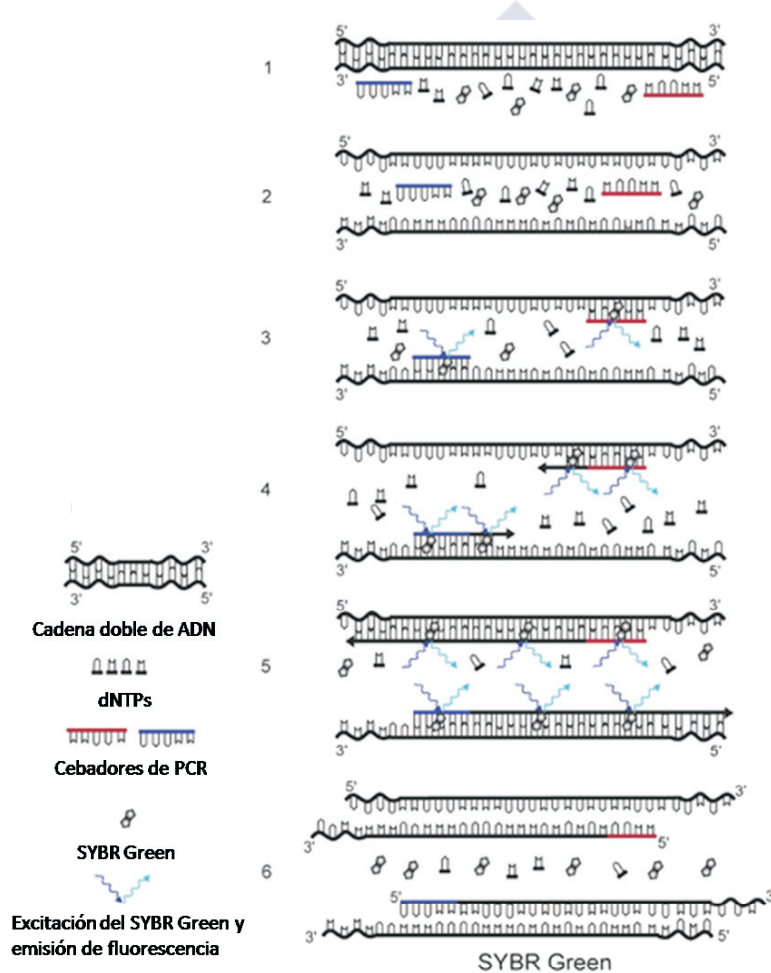


Figura 35: Descripción del principio de detección del *SYBR Green* en PCR en tiempo real. 1) El marcador fluorescente *SYBR Green* se añade a la mezcla de PCR. 2) El *SYBR Green* presenta fluorescencia cuando se une a la doble cadena de ADN. 3) Al comienzo de la reacción, hay muy poco ADN de doble cadena presente, por lo que la señal fluorescente detectada por el termociclador es baja. 4) y 5) A medida que avanza la reacción y el producto de PCR se acumula, aumenta la cantidad de ADN de doble cadena y, con ello, la señal de fluorescencia. 6) La señal solo es detectable durante el anillado y extensión, ya que, durante la desnaturalización, el DNA presente es principalmente monocatenario. (Modificado a partir de da Silva & Pieniazek, 2003).

3. Materiales y métodos

En los primeros ciclos no se observa aumento de la fluorescencia, ya que la cantidad de copias sintetizadas no es suficiente para poder ser detectadas. A continuación, se producen unos ciclos de la fase exponencial, a medida que el producto amplificado sobrepasa el umbral de detección de la fase inicial. Finalmente, tiene lugar la fase no-lineal o de meseta, donde la fluorescencia no aumenta o prácticamente no se nota, debido a la acumulación de productos que inhiben la reacción o por agotamiento de los distintos reactivos.

Bustin *et al.* (2009) redactaron la guía MIQE, donde se ha procurado consensuar las posturas de la comunidad científica, explicando la importancia de la estrategia de normalización y los pasos que se deberían llevar a cabo para realizar una RT-qPCR y asegurar su relevancia, precisión, correcta interpretación y posible repetitividad. Se presenta una lista de control, que se debería de seguir, para llevar a cabo una correcta RT-qPCR.

Para cuantificar la cantidad de cDNA de la muestra de partida, es preciso hacerlo cuando la amplificación en la reacción es exponencial, es decir, en la zona donde la curva empieza a levantar y no en la región lineal de la curva. Esto se calcula fijando el umbral o *threshold*, que debe localizarse en la parte exponencial de la reacción y que puede ser establecido automáticamente por el programa o manualmente por el usuario. El punto en el cual la curva generada por la fluorescencia emitida es cruzada por esta línea genera los valores conocidos como Cq (ciclo de cuantificación). Según la guía MIQE (Bustin *et al.*, 2009), el Cq debería reemplazar al término empleado anteriormente, que era Ct (ciclo umbral o *threshold cycle*). El valor Cq estará representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido (Bustin, 2005). Estos son los valores que se recogen para hacer los posteriores análisis.

El software del termociclador forma unas gráficas que representan las curvas generadas por la amplificación exponencial, con sus distintas fases. La línea que simboliza el umbral genera puntos de corte sobre las curvas, que determinarán los valores de Cq. Se puede observar un ejemplo en la figura 36.

3. Materiales y métodos

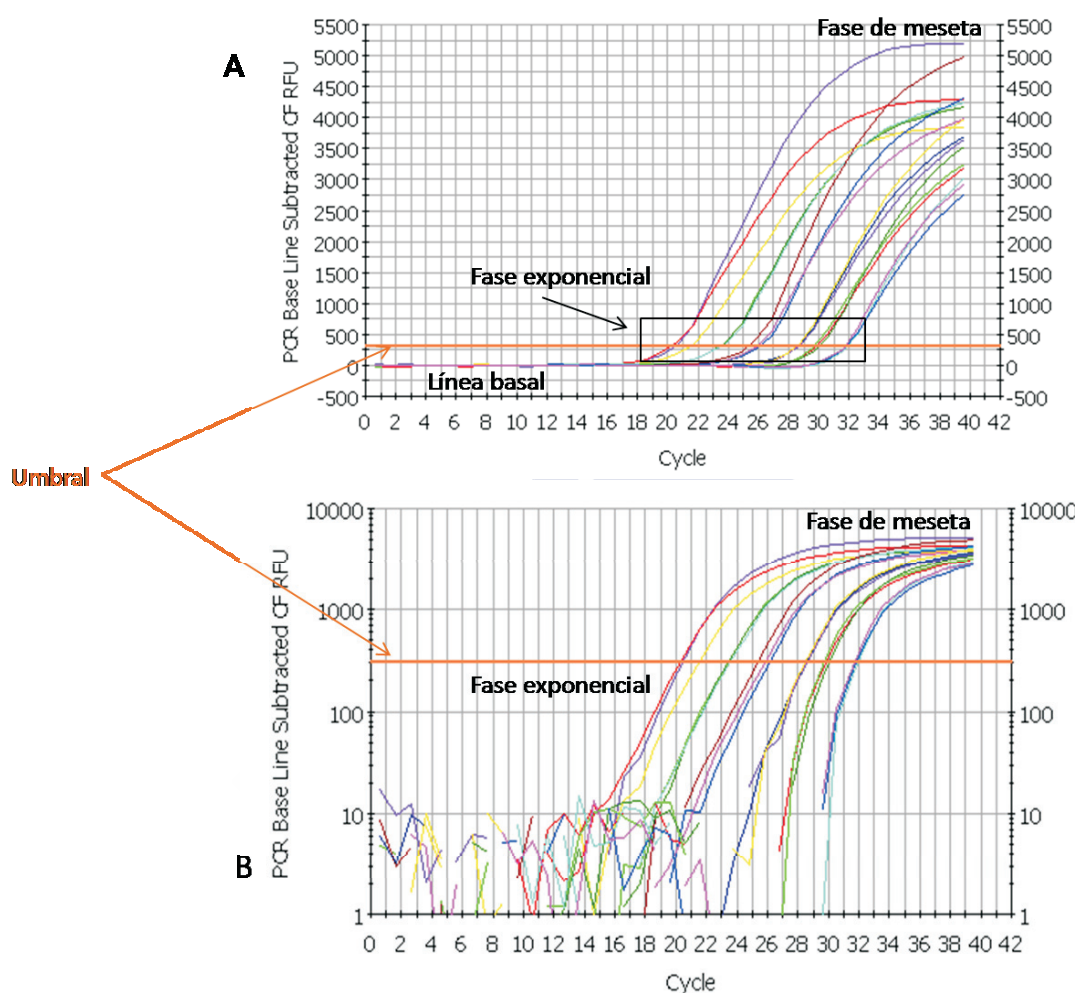


Figura 36: Gráficas generadas por el iCycler. En la figura A se pueden observar las fases de la PCR, y la línea de umbral establecida para estimar los valores de Cq. La figura B, es la representación logarítmica, donde la fase exponencial para establecer el umbral, es más evidente.

Un método importante de control, es comprobar que todas las muestras tienen una temperatura de fusión adecuada (T_m o *melting temperature*), ya que cada amplicon tiene una T_m característica. Tras la amplificación por PCR, el termociclador puede ser programado para hacer una curva de fusión (*melting curve*), en la cual se eleva la temperatura desde 60°C hasta 100°C, en incrementos de medio grado, y se mide el cambio en la fluorescencia.

El fluoróforo empleado no distingue entre un DNA y otros diferentes de los que se tratan de amplificar. Si los picos no son similares o aparecen más de

3. Materiales y métodos

uno, esto podría sugerir una contaminación, presencia de dímeros o cualquier artefacto que se crease en la reacción (Figura 37). Es necesario estar seguro de que lo único que se detecta con el fluoróforo es lo esperado, que sería un fragmento específico de DNA correspondiente al tamaño predicho, según la posición de los cebadores en el cDNA. Normalmente, el análisis de la curva de fusión se complementa con una electroforesis en gel de agarosa, donde se puede observar si se ha obtenido un fragmento del tamaño esperado o se han generado productos inespecíficos.

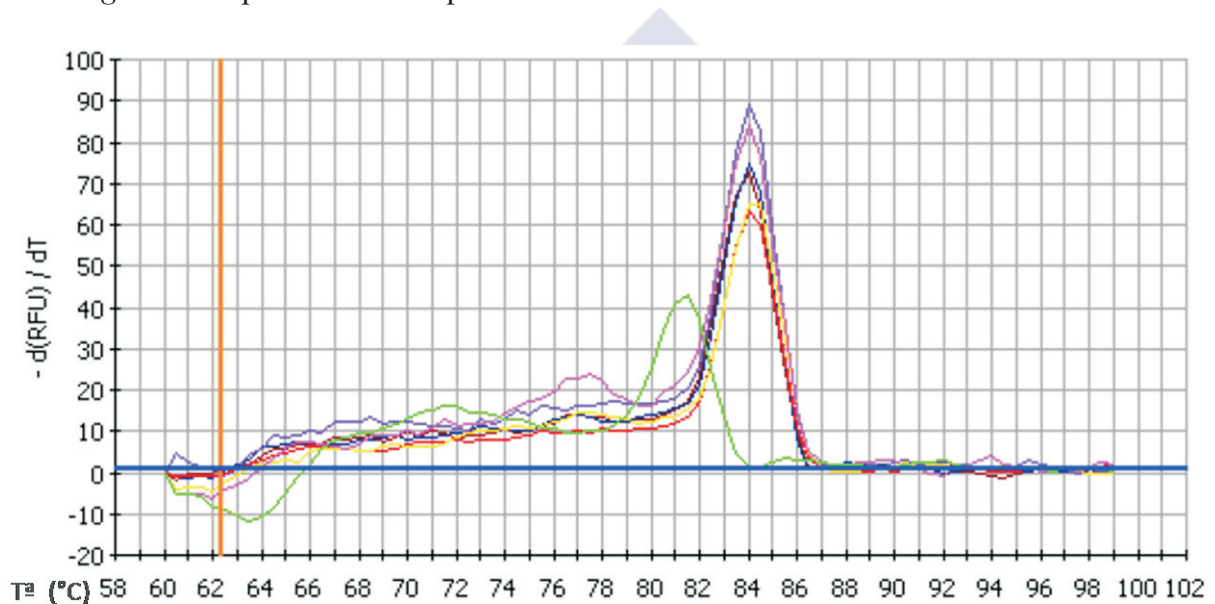


Figura 37: Gráfica generada por el iCycler, que muestra la formación de curvas de *melting*, correspondientes a los productos obtenidos. Es posible observar la aparición de contaminaciones en las reacciones. La curva con dos picos (rosa), indica la presencia de un producto doble, o la formación de un dímero, además del producto. La curva con el pico desplazado (verde), corresponde a la presencia de un producto inespecífico.

Para obtener resultados fiables, es necesario optimizar la reacción de PCR, que consiste en procurar que las variaciones generadas en el experimento no provoquen efectos importantes en los valores Cq. Para ello, se han de revisar ciertos factores, como las mezclas maestras de reactivos, la concentración de los cebadores, la concentración de marcadores fluorescentes y la concentración de la muestra de partida. Se han de realizar distintas combinaciones hasta encontrar aquellas en las que se observa resultados óptimos, en términos de la curva de fusión y de la eficiencia de la amplificación.

3. Materiales y métodos

La eficiencia (E) de la PCR es la capacidad que presenta la reacción de aumentar el número de copias de las cadenas de DNA o cDNA en cada ciclo (Bustin & Nolan, 2004). Para calcular la eficiencia de las reacciones, se utilizan las pendientes obtenidas de la curva estándar, tras realizar diluciones seriadas para cada gen (Pfaffl, 2004), de acuerdo a la siguiente fórmula: $E=10^{(-1/\text{pendiente})}-1$

Para este estudio se realizó una cuantificación relativa, empleada para medir cambios en los niveles de expresión genética, donde el gen a analizar se compara con uno o más genes de referencia (Pfaffl, 2004). Por tanto, los datos obtenidos por RT-qPCR se han de normalizar con un control interno, que suelen ser varios genes de referencia. El uso de este control permite la corrección de errores sistemáticos que pueden darse durante todo el proceso, tales como la cantidad y calidad del material de partida, los errores de pipeteo, la cantidad y la calidad de RNA obtenido, cambios en las eficiencias enzimáticas o la presencia de inhibidores de la reacción (Bustin, 2002; Vandesompele *et al.*, 2002).

Los genes de referencia que se usen para la normalización han de ser estables en expresión durante las condiciones experimentales, ya que si son poco estables puede producir resultados incorrectos (Bustin, 2000). Para comprobar su estabilidad se han desarrollado varios métodos estadísticos que detectan el gen o genes más apropiados para la normalización, en unas condiciones determinadas. Los programas más empleados son: geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) y BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004). Se ha sugerido la conveniencia de usar varios genes para medir con precisión la expresión del gen que se quiere analizar (Tricarico *et al.*, 2002; Vandesompele *et al.*, 2002; Pfaffl *et al.*, 2004; Huggett *et al.*, 2005).

Una vez se han realizado todas las reacciones del experimento, los cálculos necesarios para llevar a cabo la cuantificación relativa de la expresión genética, precisan de los valores de Cq y eficiencia. Estos se transformaron y normalizaron como se explica más adelante (apartado 3.4.5. *Análisis de los datos*), para hacer el análisis final, y obtener los resultados de expresión entre los distintos casos.

3. Materiales y métodos

En esta investigación, se ha querido realizar un análisis del mRNA que codifica para las proteínas de membrana MDR, para comparar su expresión en tres tejidos importantes y observar en cuál de ellos habría más actividad. También se analizaron las mismas proteínas en muestras recogidas a lo largo de un ciclo de intoxicación por DSP, con el fin de observar si existía alguna relación entre la inducción de la expresión de este tipo de proteínas y la presencia de toxina DSP en el medio.

3.4.2. Muestras

Se diseccionaron la glándula digestiva, las branquias y el manto de 18 mejillones para comparar la expresión de los genes que queremos estudiar entre los tres tejidos (glándula digestiva, branquia y manto). Los individuos se obtuvieron de la ría de Arousa (A Pobra do Caramiñal), extraídas el 29 de septiembre de 2009. Los tejidos de las muestras se trataron con *RNAlater* (Ambion, Applied Biosystems), siguiendo el protocolo del fabricante, y se conservaron a -20°C o -80°C (tal como se indica en el apartado 3.3.1. *Muestras*).

Los 18 mejillones empleados para el estudio de expresión en los tejidos se recogieron dos meses después de la desaparición en el medio del plancton tóxico, por lo que también se utilizaron como control en el otro estudio, ya que están libres de toxinas. Otros mejillones fueron recogidos en las bateas de la ría de Pontevedra (Bueu), tras la aparición de una marea tóxica el 28 de junio de 2010 y la consecuente acumulación de biotoxinas en los organismos. Se recogieron 15 individuos (5 mejillones de diferentes profundidades: 1, 5 y 10 metros) para cada muestreo, durante el desarrollo temprano de una floración de microalgas de *Dinophysis acuminata*, que provocó el cierre de los parques de extracción debido a la presencia de ácido ocadaico.

Los demás muestreos se realizaron a los dos (Bueu 1), diez (Bueu 2), dieciséis (Bueu 3) y setenta y nueve días (Bueu 4), después del cierre de los parques de extracción, por la presencia de toxina diarreica (DSP). También se analizaron 15 individuos (5 mejillones de cada una de las tres profundidades), obtenidos durante el inicio del desarrollo temprano de la floración, en la ría de Arousa

3. Materiales y métodos

(Grove, recogidos el 14 de julio de 2010. Se pensaban usar como control, ya que pertenecían a un polígono que estaba abierto, pero, a la hora de analizar la concentración de ácido okadaico, se encontró que los ejemplares estaban intoxicados, y se decidieron incluir en el análisis). Los animales fueron suministrados por el INTECMAR (*Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño de Galicia. Xunta de Galicia. Consellería do Medio Rural e do Mar*) y los datos, consultados en la web de este centro. Finalmente, se obtuvieron seis grupos diferentes de mejillones, con un total de 93 muestras.

De la glándula digestiva extraída de los individuos, parte fue conservada con *RNAlater* (Ambion, Applied Biosystems), mientras que lo demás fue enviado al *Centro de Investigacións Mariñas (CIMA-Coron)*, para que la concentración de ácido okadaico (ng/g) fuese medida en todas las muestras. Para la cuantificación del ácido okadaico total (ácido okadaico + formas conjugadas), se diseccionaron las glándulas digestivas y se extrajeron las toxinas mediante homogeneización con metanol 100% en una proporción (1:4, p:v). El homogeneizado obtenido se clarificó por centrifugación a 48.000 g durante 20 minutos. Una alícuota de este extracto se sometió a una hidrólisis alcalina, según el procedimiento de Vale & Sampayo (1999), ligeramente modificado.

Brevemente, el método consistió en agregar 62,5 μL de NaOH 2,5 N a 0,5 ml de extracto, calentarlo a 76°C durante 40 minutos en un vial cerrado y finalmente neutralizar el extracto, agregando 62,5 μL de HCl 2,5 N. El análisis del extracto hidrolizado, previa filtración por un filtro de jeringa de Nylon, de 0,22 μm de poro, se llevó a cabo por HPLC-MS/MS con SPE online, según la técnica de Regueiro *et al.* (2011), con un sistema cromatográfico Thermo Accela acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Thermo Quantum Access MAX), por medio de una interfase electrospray HESI-II. La cuantificación se llevó a cabo mediante la comparación de la respuesta obtenida en el análisis de las muestras con la de una solución de referencia de ácido okadaico suministrada por el NRC (National Research Council) de Canadá.

3. Materiales y métodos

3.4.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.

Para la branquia y el manto, el RNA total se obtuvo de ≈ 20 mg de tejido de los individuos, con el kit *NucleoSpin RNA II* (Macherey-Nagel), siguiendo las directrices explicadas anteriormente (en el apartado 3.3.2 *Extracción del RNA Total*).

Para la glándula digestiva, se partió de alrededor de 30 mg de tejido y se hizo la extracción con un kit similar, el *RNAqueous* (Ambion). El protocolo para la extracción de RNA con este kit sería el siguiente: la muestra fue desmenuzada y homogeneizada en un tubo con entre 10–12 μl /mg de tejido de “Lysis/Binding Solution” y resuspendido por pipeteo. La solución fue centrifugada a 12.000 g durante tres minutos, para eliminar el material insoluble. El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo y se mezcló con un volumen igual de etanol al 64%. Esta solución se pasó a una columna, para ser centrifugada y que el RNA quedase unido a la membrana.

A continuación, se realizaron unos lavados con 700 μl de *Wash Solution #1*, que se hicieron pasar a través del filtro por centrifugación y, después, dos veces con 500 μl de *Wash Solution #2/3*, a la que se le añadió, previamente, el etanol indicado en el kit. Finalmente, la columna, bien seca, se pasó a un nuevo tubo colector y se le pipetearon 30 μl de solución de elución o agua MiliQ, que se recogió en el fondo del tubo tras una centrifugación de un minuto, liberando el RNA de la membrana. Esto se repitió con el fin de arrastrar el posible RNA que aun quedara unido a la membrana y para obtener un volumen mayor de producto.

Una precipitación con LiCl 7,5 M se llevó a cabo en los RNA obtenidos de todos los tejidos, con el fin de eliminar los inhibidores de las preparaciones de RNA (como se explicó en el apartado 3.3.2. *Extracción del RNA Total*). Además, el RNA obtenido fue tratado con *TURBO DNasefree* (Ambion), para descartar cualquier tipo de contaminación del DNA y evitar la amplificación de DNA genómico. Finalmente, se diluyó en *RNA storage solution* (Ambion) para una mejor conservación (desarrollado previamente, en el apartado 3.3.2. *Extracción del RNA Total*).

3. Materiales y métodos

La cantidad y la calidad del RNA fueron verificadas mediante el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), que mide la concentración final y da una idea de la pureza de las muestras. Después de calcular la relación de absorbancia a 260/280 nm y a 230/260 nm, se pudo concluir si las muestras que se obtuvieron eran puras, es decir, sin trazas de proteína o contaminantes orgánicos, derivados de la extracción de RNA. La integridad del RNA se analizó por electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa al 1% (tal como se ha explicado anteriormente en el apartado 3.3.6. *Electroforesis de los productos de amplificación y purificación de las bandas obtenidas*). Las muestras de RNA fueron conservadas a -80°C.

La síntesis de la cadena de cDNA para la RT-qPCR fue realizada con el *iScript cDNA Synthesis Kit* (BioRad). Se transcribieron 0,6 microgramos de RNA total de cada tejido para la obtención de un volumen final de 20 µl. Las reacciones se componían de 4 µl de *5X iScript Reaction Mix* + 1 µl transcriptasa Inversa “iScrip” + agua DEPC, hasta alcanzar los 20 µl. El programa de temperaturas fue: 25°C durante 5 minutos, 42°C durante media hora y 85°C durante 5 minutos. Finalmente, todas las muestras de cDNA fueron diluidas 1:5 con agua libres de DNAsas y RNAsas y se almacenan a -20°C.

3.4.4. Genes de referencia, diseño de los cebadores y eficiencia de la PCR

Como ya se ha explicado, para realizar la normalización y poder obtener resultados correctos en los estudios de expresión, se ha de evaluar la estabilidad de una serie de genes candidatos. Se eligieron ocho posibles genes de referencia que ya fueron utilizados en otros estudios, o que se han considerado convenientes, por su posible estabilidad durante los experimentos. Fueron: la NADH deshidrogenasa subunidad 4 (*nd4*); gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*); citocromo c oxidasa subunidad I (*cox1*); proteína de fusión ubiquitina - proteína ribosomal S27 (*rps27*); factor de iniciación de la traducción 5A (*tif5a*); 40S proteína ribosomal S4 (*rps4*); actina (*act*) y 18S RNA ribosomal (*18S*). Además, se hizo preciso diseñar nuevos cebadores de los dos genes de estudio (P-glicoproteínas: *mdr1* y *mdr2*), convenientes para poder

3. Materiales y métodos

obtener un fragmento que amplifique un producto con el que comparar frente a los genes de referencia y así observar la forma en que se expresan en presencia de la toxina DSP y entre los distintos tejidos. Véase, a continuación, la tabla 5.

Tabla 5. Secuencia de los cebadores, tamaño del amplicon (fragmento amplificado), número de acceso de los genes usados para el experimento de expresión y su función.

Nombre		Secuencia 5'-3'	Número de acceso	Amplicon (pb)	Función	
<i>mdr1</i>	Fw	GTGGGCTCTAGCTCTTGTTG	FM999809	126	Transportadores de membrana	
	Rv	GTCTTCCCAGCCTCCTCTAG				
<i>mdr2</i>	Fw	TGGAGCCTATGCTCTTGGG	NC_006886	131		
	Rv	CAACATTACCAATGGACCACGC				
<i>nd4</i>	Fw	CAGCCCCACCTAGTCTAAATC	NC_006886	114		Reacciones redox
	Rv	AGCAAGCCCTAATAAAGCTCATC				
<i>gapdh</i>	Fw	AGGAATGGCCTTCAGGGTAC	AJ625093, FL593798, FL496349	114	Enzima glicolítico	
	Rv	TCAGATGCTGCTTTAATGGCTG				
<i>cox1</i>	Fw	TGCTCATTGGCATTGGGTGTC	NC_006886	151	Enzima metabolismo aeróbico	
	Rv	AGTTCCTGCTCAGTCCATCTCAC				
<i>rps27</i>	Fw	CGTGAATGTCCAACGAAGAG	AJ625324, AJ516561, AJ625501	114	Componente estructural proteína ribosomal 40S	
	Rv	TGTTGCCTCTGGTTTGTGA				
<i>rps4</i>	Fw	TGGGTTATCGAGGGCGTAG	FL492874	138		
	Rv	TCCCTTAGTTTGTGAGGACCTG				
<i>tif5a</i>	Fw	ACGCTACTTGACATTAACGAT	FL593258	171		Traducción del DNA
	Rv	AGCTAGTTCTTCTCCCATAGC				
<i>18S</i>	Fw	TCGATGGTACGTGATATGCC	Dondero et al. (2005), L33452	84	Estructura ribosomal	
	Rv	CGTTTCTCATGCTCCCTCTC				
<i>act</i>	Fw	TCTTGATTCGAGCAGGAAATG	AF157491	121	Proteína estructural del citoesqueleto	
	Rv	GGATGGTTGGAATAATGATTCTG				

3. Materiales y métodos

A partir de las secuencias de estos genes para el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), se diseñaron los cebadores, siguiendo las pautas y usando los programas previamente descritos, en el apartado 3.3.4. *Diseño de cebadores*. Para obtener una eficiencia óptima de reacción, el tamaño de los fragmentos debería oscilar entre los 100 y 200 pares de base (pb); las secuencias obtenidas para los genes de esta investigación variaron entre 84 y 171 pb. Todos los cebadores empleados fueron sintetizados por Thermo (Alemania). Los nombres de los genes, abreviaturas, su función y las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla 5 (página anterior).

A continuación, lo que se hizo fue comprobar la especificidad de los amplicones, es decir, que los fragmentos esperados amplificasen correctamente y que no apareciesen dímeros de cebadores u otros productos. Esto se confirmó corriendo las reacciones en un gel de agarosa al 2% (debido al pequeño tamaño de los fragmentos) y purificando las bandas obtenidas para secuenciarlas y corroborar que son lo esperado. Para ello, también se usó la T_m y la curva de fusión, que debería presentar un único pico.

La eficiencia de las PCR (E) y el coeficiente de correlación fueron determinados con el Bio-Rad iQ software V3.1. Se calcularon, utilizando las pendientes de las curvas de calibrado generadas a partir de los valores C_q de diluciones seriadas de cDNA (en Anexo 8.4. *Medidas, geles y gráficas de la RT-qPCR*), según la siguiente ecuación:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1 \text{ (Kubista et al., 2006),}$$

o expresada como porcentaje:

$E(\%) = [10^{(-1/\text{pendiente})} - 1] \times 100$, con valores entre 0 y 100, teniendo en cuenta que el 100% debe ser considerada como la eficiencia máxima.

Las eficiencias fueron calculadas usando diluciones seriadas de cDNA 1:5 para los genes de referencia. Debido a la alta abundancia del 18S, para esta proteína, se empezó con una solución inicial más diluida, 1:3125 en relación al resto

3. Materiales y métodos

de los genes. Debido a algunos problemas, para la *mdr1* se utilizó una serie de diluciones de 1:5 en glándula digestiva, 1:4 en la branquia y 1:5 de producto purificado de PCR para el manto. Para la *mdr2* se utilizó una serie de diluciones 1:4 en los tres tejidos, debido a que al ser genes que se expresan poco, la cuantificación en el iCycler comienza en un valor muy elevado y, al usar diluciones 1:5, se sale del rango que es capaz de analizar el programa. Además, se realizaron controles negativos de ausencia de DNA genómico (*no RT control* o control sin transcripción inversa) y de ausencia de contaminación (NTC: *non-template control*), que se incluyeron en todas las reacciones de eficiencia, para evitar posibles contaminaciones.

3.4.5. RT-qPCR

La RT-qPCR se llevó a cabo en placas de 96 pocillos en la máquina iCycler iQ™ (BioRad). Las reacciones, con un volumen final de 20 µl, estaban compuestas por 10 µl de *SsoFast EvaGreen Supermix* de BioRad (que contiene 2x reaction buffer con dNTPs, la enzima Sso7d- fusión polymerase, MgCl₂ y el marcador fluoróforo *EvaGreen*) + 4 µl de cDNA diluido 1:5 (24 ng de cDNA) + 0,8 µl de cada uno de los cebadores, para obtener una concentración final 400 nM + 4,4 µl de agua para PCR. Se añadieron controles con agua en lugar de cDNA, para descartar la contaminación por DNA. En esta situación, también fue necesario volver a diluir las muestras del gen *18S*, partiendo de una dilución 1:5000 para la glándula digestiva, mientras que para la branquia y el manto fueron diluidas 1:25000.

Las reacciones, una vez preparadas, se introdujeron en el termociclador con el siguiente programa: 95°C durante 30 s, seguido por 40 ciclos con una desnaturalización a 95°C durante 5 s, seguido de un anillado y una elongación a 60°C durante 10 s y, por último, para medir la fluorescencia, se lleva a 75°C durante 10 s. Finalmente, se llevó a cabo una curva de fusión (*melting curve*), desde los 60°C hasta llegar a los 100°C, con un aumento de la temperatura de 0,5°C cada 10 segundos.

3. Materiales y métodos

3.4.6. Análisis de los datos

Una vez que acabó la reacción, se recogieron los datos. En este punto, se podían utilizar los valores obtenidos directamente del iCycler IQ™ (tanto las eficiencias obtenidas para cada gen como los valores de Cq), o bien se podían importar los datos sin procesar (*raw data*) de los valores de fluorescencia obtenidos. Estos se transformaron con el algoritmo de Miner (Zhao & Fernald, 2005), que calcula las eficiencias y los Cq de cada reacción de PCR. Utiliza el nivel de ruido de la fase inicial, antes de la amplificación, para determinar el punto de partida de la fase exponencial (SPE) y el primer término positivo de la segunda derivada (SDM) del modelo logístico, en el punto final de la fase exponencial (EPE), que se utiliza para determinar el Cq. La eficiencia se calculó haciendo una media de las eficiencias obtenidas con el iCycler, usando las diluciones seriadas para cada tejido.

Una vez se obtuvieron todos los datos necesarios, lo primero que se hizo fue un análisis de los genes de referencia para ver cuáles eran más estables y, por tanto, los más convenientes para llevar a cabo la normalización. Se tuvo en cuenta que trabajar con los valores de Cq sin procesar no era suficiente para calcular la estabilidad de la expresión génica. Por tanto, se convirtieron en un archivo con valores de entrada válidos, dependiendo de los requisitos de cada software. Los datos fueron analizados mediante tres herramientas basadas en la hoja de cálculo Excel.

En el geNorm y NormFinder, para transformar las cantidades relativas (RQ), fue necesario emplear la eficiencia de cada par de cebadores (E), junto con los valores de Cq, usando la siguiente ecuación (Hellemans *et al.*, 2007):

$$RQ = (1+E)^{\Delta Cq}$$

ΔCq = valor de Cq más bajo para cada par de cebadores - valor de Cq para cada amplificación.

Por su parte, el software Bestkeeper realiza un análisis descriptivo utilizando los valores de Cq directamente para cada gen (Pfaffl *et al.*, 2004). Cada uno de

3. Materiales y métodos

los programas, emplea un algoritmo propio para evaluar el gen de referencia más estable. Ninguno de los métodos ha sido aceptado como el más correcto para identificar la estabilidad de la expresión génica, por lo que todos ellos se utilizaron para el análisis.

geNorm calcula M (estabilidad de la expresión de los genes) como la variación media por parejas para cada gen, con todos los genes de referencia ensayados. Los genes con un valor bajo de M presentan una expresión estable y los que tienen un valor de M alta serán más inestables. Después de la eliminación del gen con el mayor valor de M, se vuelve a realizar el cálculo con los genes restantes y así sucesivamente, hasta que solo quedan los dos genes más estables. Permite ordenar los genes analizados en concordancia a su estabilidad de expresión. Además, geNorm también calcula un factor de normalización para cada muestra, basado en los genes de referencia más estables, e informa del número óptimo de los genes necesarios (Vandesompele *et al.*, 2002).

NormFinder utiliza un modelo estadístico, que permite la estimación de la variación total de los genes candidatos de normalización y la variación entre los subgrupos de la muestra, para así evaluar la estabilidad de expresión (Ander sen, 2004).

El análisis con BestKeeper empieza con el cálculo de estadísticos descriptivos estándares para los genes investigados y emplea un coeficiente de correlación entre los pares de cada gen y el índice de BestKeeper, calculado como la media geométrica de los valores de Cq de todos los genes agrupados. La estabilidad, puede deducirse por los valores obtenidos de la desviación estándar (SD) y del coeficiente de correlación (r) (Pfaffl *et al.*, 2004).

Una vez se decidió qué genes eran los más estables y el número necesario de genes de referencia para la normalización, se emplearon los datos importados para evaluar la expresión de los genes entre el control y las distintas situaciones, por un lado, y entre los tres tejidos, por el otro.

3. Materiales y métodos

Para ello, previamente se hizo el cálculo de la expresión normalizada de los genes de estudio frente a los genes de referencia. La expresión de cada gen se obtiene a partir de su Cq, utilizando la siguiente ecuación: Expresión gen = $(1 + E_{gen})^{-Cq_{gen}}$. A continuación, se divide la expresión de los genes de estudio entre la media geométrica de las expresiones de los genes de referencia, como se indica en la ecuación que nos da la expresión normalizada del gen:

$$\text{Expr. norm. gen} = \frac{(1 + E_{gen})^{-Cq_{gen}}}{\sqrt[n]{(1 + E_{ref1})^{-Cq_{ref1}} \times (1 + E_{ref2})^{-Cq_{ref2}} \times \dots \times (1 + E_{refn})^{-Cq_{refn}}}}$$

Los resultados fueron analizados con la herramienta de software de la expresión relativa (REST), versión 2.0.7 (Pfaffl *et al.*, 2002), que usa un test de randomización con redistribución por pares, con el fin de evaluar la significación estadística de las diferencias de expresión, entre cada dos casos.

Además, el estudio de expresión de las proteínas MDR se completó con un análisis estadístico, que se llevó a cabo con el software IBM SPSS 19.

Los datos de expresión normalizada fueron transformados mediante el logaritmo en base 2 de la expresión normalizada relativa. Esto se hace para que los valores presenten una distribución normal. El análisis de varianza (ANOVA) se realizó después de verificar las hipótesis de normalidad de la distribución de datos, mediante la prueba de Shapiro-Wilk, y la homogeneidad de varianzas, mediante el test de Levene. Las diferencias estadísticas fueron estimadas por un análisis de varianza de una vía (ANOVA) entre los grupos, con un nivel de significación definida como $p < 0,05$. Por último, se llevaron a cabo las comparaciones *post hoc* asumiendo varianzas iguales (HSD de Tukey y test bilateral t de Dunnett), para identificar las diferencias de expresión entre los tres tejidos, por un lado, y la diferente acumulación de toxinas, por el otro.

4. RESULTADOS

4.1 Obtención de los fragmentos. Análisis de las secuencias y caracterización de los genes *mdr* en *Mytilus galloprovincialis*

Para poder obtener la secuencia completa de la proteína, lo primero que se tuvo que hacer fue extraer el tejido en cuestión. En este caso, se partió del manto del mejillón. De este se obtuvo el RNA total y, a continuación, se llevó a cabo la síntesis, por transcripción inversa, de DNA complementario. Usándolo como plantilla, se procuraron obtener las secuencias de las dos P-glucoproteínas identificadas. Se comenzó a partir de un fragmento inicial, que, una vez secuenciado, sirvió para hacer el diseño de nuevos cebadores e ir extendiendo la secuencia hacia sus extremos.

Para ello, se realizaron PCR RACE 5' y PCR RACE 3', y se confirmaron determinados fragmentos, mediante RT-PCR (tal como se explicó en el apartado 3.3.5. *Clonación de fragmentos de cDNA de las proteínas MDR por PCR y "rapid amplification of cDNA ends" o RACE PCR*). Una vez clonados, la información derivada de la secuenciación fue ensamblada.

Finalmente, se obtuvieron dos secuencias completas, que codificaban para proteínas transportadoras ABCB en el manto de *Mytilus galloprovincialis*. Se puede observar la estrategia que se llevó a cabo, para la obtención de los distintos fragmentos, en la Figura 38, de la página siguiente.

Como se puede observar en la Figura 38, la obtención de la secuencia del gen *mdr1* se consiguió con una PCR inicial de unos 400 pb, confirmada con 6 clones. Partiendo de este fragmento, se obtuvo la secuencia completa con cuatro *RACE PCR*, una en sentido 5' de aproximadamente 1,8 kb y obtenida a partir de 9 clones diferentes. En cambio, hacia el lado 3' fueron necesarias tres *RACE PCR*. La primera, que continúa el fragmento inicial, era de 1 kb y se ratificó por la presencia de 5 clones; a continuación, se prolongó la secuencia con un fragmento de unos 1500 pb, estructurada a partir de 11 clones distintos. Finalmente, se confirmó el extremo 3' con 5 clones de una *RACE* de alrededor de 200 pb.

4. Resultados

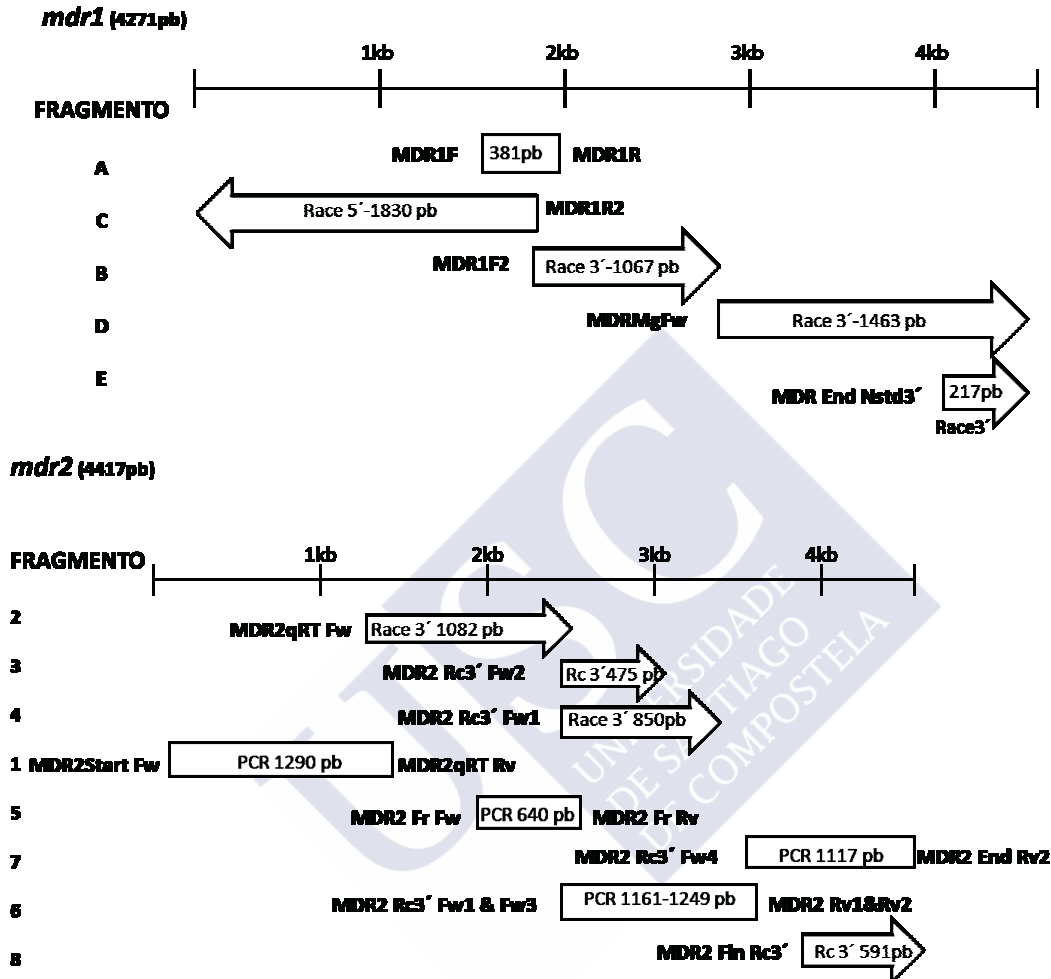


Figura 38. Estrategia de clonación en el mejillón *M. galloprovincialis*, para la obtención de las secuencias de las dos *mdr*. La secuencia completa de la *mdr1* y *mdr2* se completa a partir de fragmentos obtenidos por RACE 5' y 3' y PCR convencionales. Se obtuvo una secuencia de 4271 pb, para *mdr1*, y 4417 pb, para *mdr2*. Se indican los nombres de los fragmentos, los cebadores, la dirección y el tipo de reacción empleada para la obtención de cada fragmento.

Por otra parte, para conseguir la secuencia completa de *mdr2* fueron precisas 9 reacciones diferentes, 4 *RT-PCR* y 5 *RACE PCR* (una 5' y cuatro 3'). Parte de la secuencia es posible localizarla en las bases de datos, con número de acceso EF137955, obtenida en 2006 en la universidad de Niza, Francia. Partiendo de ella, se diseñaron cebadores con el fin de confirmar la secuencia completa, hasta las zonas no codificantes de los extremos. El fragmento 1 de unos 1300

4. Resultados

pb se obtuvo con una RT-PCR con los cebadores MDR2Start FW + MDR2qRT Rv, del que se obtuvieron 6 clones. La zona no traducida 5' se completó usando la secuencia EF137955.

La secuencia se extendió con tres *RACE PCR 3'*, una de ellas de aproximadamente 1,8 kb y, a continuación, otras dos *RACE 3'*, donde se usaron cebadores que se encuentran muy próximos entre ellos, por lo que confirmaron la misma región de la secuencia final: una de 5 clones que comprendía cerca de 500 pb y otra de 850 pb, estructurada a partir de 7 clones distintos. Como estas dos últimas *RACE PCR* prácticamente no solapaban con el fragmento anterior, esta zona fue reforzada con una RT-PCR usando los cebadores MDR2FR Fw + MDR2FR Rv, que amplificaron un fragmento de 640 pb y de los que se obtuvieron 7 clones.

La secuencia del extremo 3' se obtuvo de una forma curiosa. En uno de los intentos de extender la secuencia, desde el primer NBD hacia el lado 3', uno de los clones obtenidos de casi 600 pb (fragmento 9) presentaba una elevada identidad, con una proteína MDR. Lo que no cuadraba era que el campo abierto de lectura presentaba varios codones *stop* y se suponía que, tras el primer NBD, aún faltaban el dominio transmembrana y el segundo NBD. Esto podía ser debido a la presencia de un intrón en la proteína, o bien a que el cebador, al estar diseñado de una zona bastante conservada, se uniera en el segundo NBD y el *stop* se debiera a que se hubiese alcanzado el final de la proteína.

Para comprobar cuál de las dos posibilidades era, se diseñó un cebador después del codón *stop*, en la región no codificante, y se realizó una RT-PCR, con la que se consiguió un fragmento de unos 1100 pb, del que se obtuvieron 9 clones, que alcanzaba el extremo 3'. El solapamiento para completar la secuencia se obtuvo con otras RT-PCR, en las que se utilizó una combinación de varios cebadores (dos *forward* y dos *reverse*), que generaron 8 clones de un tamaño similar, de aproximadamente 1,2 kb, solapando con lo obtenido previamente. Esto confirmó la secuencia completa del gen que codifica para la proteína MDR2.

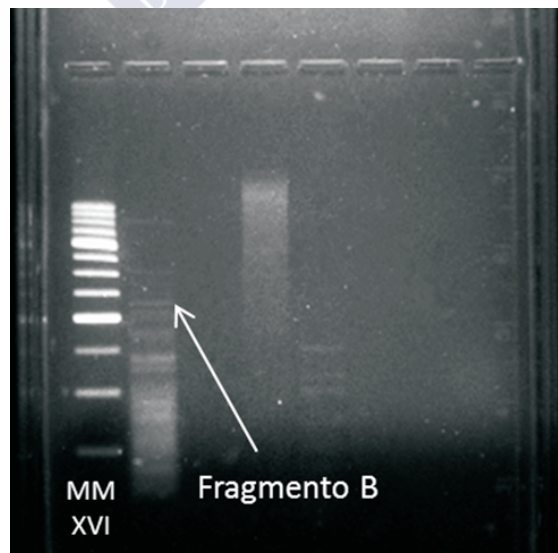
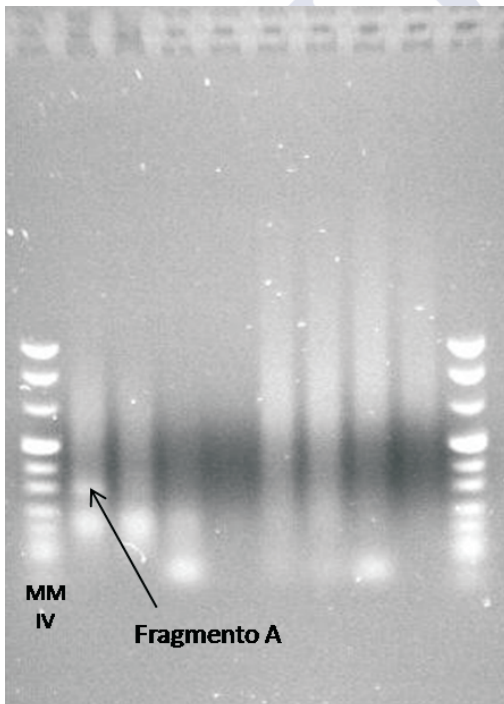
4. Resultados

Los resultados logrados a lo largo de todo el proceso para la obtención de las dos secuencias nucleotídicas (fotos de los geles con los fragmentos obtenidos por RT-PCR y *RACE PCR*, longitud en pb, cebadores utilizados y secuencia de cada fragmento) se reflejan a continuación.

MDR1

Fragmento A (MDR1F+MDR1R) 381 pb (6 clones)

```
CAGAGGTTCTATGACCCAGATGCAGGACAAGTTTTACTTGATGGTAACAACATAAAAGATTTAAATTT  
GAACTGGTTACGACAGAACATCGGTGTGGTATCGCAGGAACCAGTCTTGTTGGCTGCACCATAGC  
CGAGAACATCCGACTAGGGAATCCGAATGCAACCATTACAGAAATAGAACAAGCGGCCAAACAAG  
CCAATGCACATGACTTCATAAAAAGTCTTCCTCAGAGTTACAACACACTAGTTGGAGAGCGTGGAG  
CTCAGTTATCAGGAGGACAGAAACAACGAGTAGCCATTGCCAGAGCTTTGATTAGAGACCCAAGAA  
TCCTATTGCTGGATGAAGCTACATCTGCATTAGACTCTGAGAGTGAGAAC
```



Fragmentos A y B

4. Resultados

Fragmento B (Race 3'- MDR1F2) 1067 pb (5 clones)

CCATTGCCAGAGCTTTGATTAGAGACCCAAGAATCCTATTGCTGGATGAAGCTACATCTGCATTAGA
CTCTGAGAGTGAGAACATTGTACAGGAAGCCCTAGAAAAGGCAAGACAGGGAAGAACAACCTTGG
TGATAGCACATCGTTTGTCCACCATACAGAAAGCAGACATTATATATGTGGTGGATAAAGGAGAGATC
ATAGAACAGGGAACACATGGTGACCTGATGGACAAACAAGGACTGTATCATTCACTGGTCACTGCA
CAGACATTGGTTAATGAAGATGCAGGATTTCAAATGAGTGTGAGGACGCTGAGTTAGCACTAGATG
AGGATGAGGAAGAGGAAGCCGCAGATGCTGTACCAGATCAAACAGTTAAACGACAAAGATCAAGAA
TCAAATCTACATCATCAGATGACAAATCACCACAAAAATTGTCTCGACAACCTCTCCCGACAGACATC
AGGACTGTCTGATGGAAGGACAAAGCTGAAAAAGAGGAGGAGCCTGAAGAACAAGAAGAATATG
AACCACCGAGGTACTCCGTATGATCCATGAAAATCAACCAGAATGTGGATTATTGTGCTTGGGATT
ATGGCATCTTGTGTCGCTGGATGTACGATGCCAGCATTTGCTATATTCTTTGGAGAAATGATTAAGGT
ATTCATAGAGCTTGGAAATAATGGTCTTTTATGGAGTATGATGTTTTTGGCTCTCGGAGGAATTAATTT
TCTGGTCTATTTGTACAGGCTTCTAGTTTTGGTATATCTGGTGAGAGACTGACCCAGCGTCTCAGG
CTCGGTACATTTAATGCCTACATGAGACAAGATATAGCTTTCTATGATGACAAGTTCCACTCTACAGG
AGCTCTAACAACCAGACTGGCTACAGATGCATCCTTAGTTAAACAGCAACAGGTGTGAGAATTGG
AATGGTTTTCCAGTCAATGTTTGGACTGGTAGCAGCCCTGGTTATAGCCTTCTATTATGGGTGGGCT
CTAGCTCTTGTGTAAGTGGCATTGTACCAATAATTGGTTTTGCAAGTAGCCTACAGATAAAA

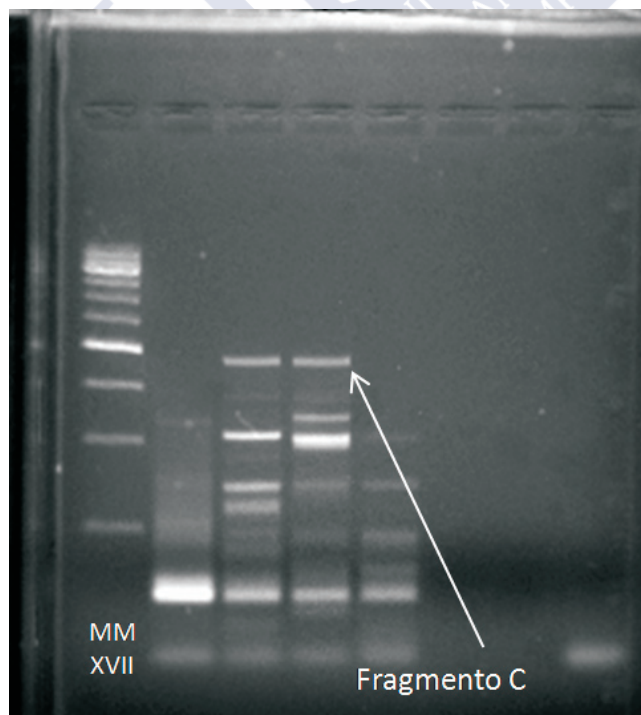
Fragmento C (Race 5'- MDR1R2) 1830 pb (9 clones)

GACTAGTTGATTTCAATTTCTTATGCAATAGCCAAATATAAATGATTACAAACTAGAGTTGTCTTTAAATT
CGGATTTACAAGTCGACAAATAAAGTTCTGTACAGAGAGTTTCCATTAGTCAGAGCTGGGACATAAT
TTATTGTTAGTATAGTAGTCCCAGGTCCGAGCGATATTTTGTATCAAGAAAATGAGTAAAAGCGAAG
AGAGAAAAGCCTCTTCTGGGTGACGCAAGTGACGAGCAGGAATCCTACACAGACAAAGATAAGAAG
AAGGACAAAGAAAAGAAAAACCAGATGGACCTCCCCAGCCACACTGGGACAATTGTTCCGCTA
TGCTACGTGTGGACATAATCTGTATCCTGTTTGGTTCCCTGTTTTCACTTGCTCATGGAGCAGGA
TGGCCAGTTTTGTCCATTGTTATGGGTCAGATGACAGACACTTTTGTAGCAGGACCAATGGATCAT
TGATACCTCCAGACCCTAATGCCACACACAATCCTAATGTTACTGTAGAATCTTTTGAAGACAAGAT
GACGACATATGCATTATATTATTAATCATTGGTGGCGTAGTACTCCTCTCTGGTTATTTACAGATCGC
ATGTTTTATGACAGCCTGTGAGAGACAAGTAAACAAGATTAGAAAACAATTTTTCCAAGCTATATTAC
GACAGGAGATTGGCTGGTTTGATAAACATCAGAGTGGTGAAGTGAACCAGATTATCGGATGATTT
AGAAAGAGTGAGAGAAGGCATCGGAGACAAGCTAAGTCTTTTGATACAGTTCGTAGCTCAGTTTTTT
GCTGGATTTGCCATTGGATTTATAAAAGTTGGAATATGACGTTAGTTATGATGCTACTGACACCTCTA

continúa...

4. Resultados

```
CTGGCCATTCTGGGTGGTTATTTCTCAGGACTGATGCAAACTTTGCGAAAAGAGAACAAGCCTTAT
ATGCTGACGCTGGAAGGTAGCAGAAGAAGTTATATCTTGATGAGAACTGTGGTATCATTTAATGGT
CAAAAACAGGAAGTAAAAGATACGAAAATCTTTGGAAGAAACAAAACAATAGGGATAAAGAAAT
CCATGGTAACTGATTTGTTGCTTGGTAGTTTATATCTTGTCATGTTTGGAGATTATGCACTGTCATTTT
GGTATGGAATGAACAAGTAAAAAATTCATAACATCTAACGGAGAAGATGGTATCACACCTGGTAC
AGTCCTCACAGTATTTTTCTGTGTAATGATTGGTAGTTTCTCAATAGGAAATGCAGCACCAAACATTG
GTTCCTTTGTAAACAGCCAAAGGCGCTGCAGCTGTTGTGTATGAAATCATTGACAGAAAACAAAAAT
AGATGCCAGTCTGAGAAAAGGACAACGCCCACTGTCAATACAAGGAGCATTACAGTTTCTTGGTGT
GAATTTACTTATCCTACAAGAGAAGATGTACAGGTGCTGACTAATTTAACCTGTCGATAAAACCTG
GACAAACTGTAGCTTTGGTAGGATCCAGTGGCTGTGGCAAATCTACCATAGTAAATCTCATACAGAG
GTTCTATGACCCAGATGCAGGACAAGTTTACTTGATGGTAACAACATAAAAGATTTAAATTTGAACT
GGTTACGACAGAACATCGGTGTGGTATCGCAGGAACCAGTCTTGTTTGGCTGCACCATAGCCGAGA
ACATCCGACTAGGGAATCCGAATGCAACCATTACAGAAATAGAACAAGCGGCCAAACAAGCCAATG
CACATGACTTCATAAAAAGTCTTCCTCAGAGTTACAACACACTAGTTGGAGAGCGTGGAGCTCAGT
TATCAGGAGGACAG
```



Fragmento C

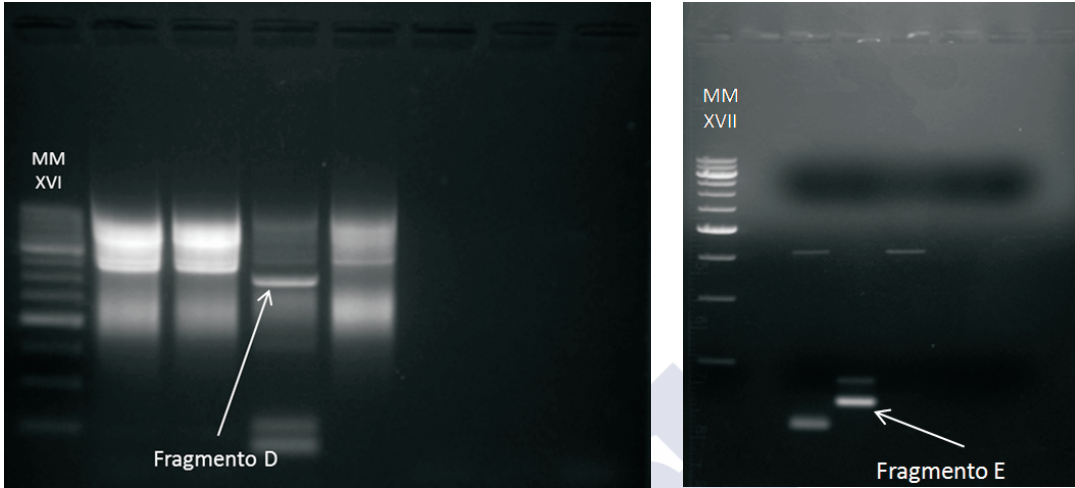
4. Resultados

Fragmento D (Race 3'- MDR MgFw) 1463 pb (11 clones)

```
GTAGCAGCCCTGGTTATAGCCTTCTATTATGGGTGGGCTCTAGCTCTTGTTGACTTGGCATTGTACC
AATAATTGGTTTTGCAAGTAGCCTACAGATAAAAGTTTTAAAGGGAAGACATGAGGAAGATAAAGGAA
AACTAGAGGAGGCTGGGAAGACAGCTGCAGAACTATTGAGAATATCAGAACTGTCCAGTCCTTGA
CCACAGAGAAACATTTCTATCACGAATATTCGCATTCTCTTGTGGGACCACTCAGATCCATGATAAA
GCAAGCCCACTGGTATGGTATAGCATTGGTTTAGGTCAAGGTGTTATCTTCATGACCTATGCTGGTG
CCTTTAGATTTGGTGCCTGGCAAGTGGAGATAGGAGAAATGACAGCTGATAATGTGTTCAAGGTGTT
CTTTGCCATTGCCTTCACTGCCATGGTGATTGGACAATCATCCTCATTCTGCCAGAGTATTCAAAG
GCCAAACATGCTGCTGGATTGATTTCAAAGCATTGGACACTGTACCATCTATAGATATATACTCCAA
AAGAGGAACGTATCTGCAAAAAGTGGATGGTTTGATACAGTTAAAGATGTCAATTTCTGTTACCCAA
CTAGACCAGAGGTAAAGGTCTTGAAGGGAGTGAATATGAAGGTGGAGCCAGGACAGACTGTGGCT
CTTGTGGGACAAAGTGGGTGTGGCAAGTCTACAGTTATCTCCCTTTTACAGAGATTCTATGATCCTG
AGTCAGGGGAAATTATGATAGATGGTATAGATATAAAAGACCTACATCTTCACAAAATGAGGTCATTA
TTAGCGTGGTCAGTCAGGAACCGATCCTGTTAATTGTAGTATCAGTGACAACATAGCTTATGGTCTG
GAGGAAACTGCAGGGATGGATGATGTTATTGCTGCTGCTAGAGATGCTAATATTCATGAGTTTATTAC
TAGTCAGCCAATGGTTATGACACAATAGTTGGTGAGAAGGGGACACAACCTGTCTGGTGGACAGAA
GCAGCGTGTGGCCATAGCAAGAGCTTTGATTAGAAATCCCAAATTCCTTGTTAGATGAGGCTACA
TCAGCATTAGATTCAGAGAGTAAAAGTTGGTACAAGAAGCATTAGACAAAAGCACAAGAAGGTCGT
ACATGTATTGTGATAGCCCATCGTCTTTTACGATTGAGAATGCTGATGTGATCTTTGTAATGGACAGT
GGCGCCATCGTAGAAAGTGGTACACACCAGACTCTTTTAGCGAAGAAAGGAGTGACAATTCCTTA
GTTAGTGCACAGCAGTTTATAAAATAGTATTTAACATATATTTAGGATTTTTTAATTTGTTGACTTTTTT
AAAATTTATATTATGTAATAAAGGTCCTTGACCTCATTTCAGGATTTTTGTTCACTCCAGTATTA
AAATTGTGATGAATCAGTTTACTAAATGTATTAATAATATAAA
```

Véase, en la página siguiente, imagen de los fragmentos D y E.

4. Resultados



Fragmentos D y E

Fragmento E (Race 3'- MDR End Nested3') 217 pb (5 clones)

```
GTAGAAAGTGGTACACACCAGACTCTTTTAGCGAAGAAAGGAGTGTACAATTCCTTAGTTAGTGCAC
AGCAGTTTATAAAATAGTATTTAACATATATTTAGGATTTTTTAATTTGTTTGTACTTTTTTAAAATTTATAT
TATGTAATAAAGGTCACCTTGACCTCATTTTCAGGATTTTTGTTTCATACTCCAGTATTAATAATTGTGAT
GAATCAGTTTACTAAATGTATTAATAATATTA
```

MDR2

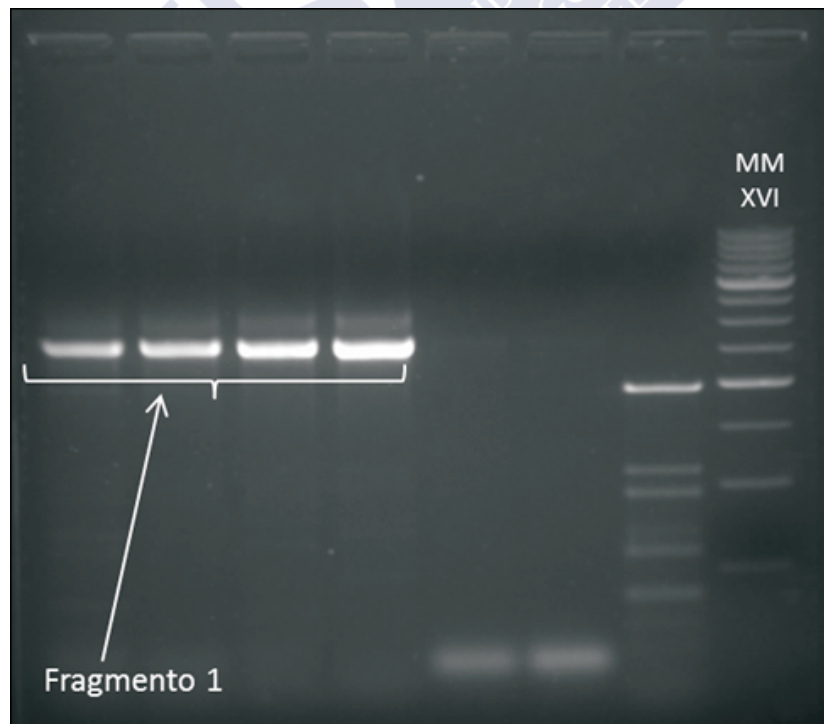
Fragmento 1 (MDR2Start Fw + MDR2qRT Rv) 1290 pb (6 clones)

```
TGCCAGAACCAGAATTATTGGGATATAAGCCTACAGCTACAGAAGGAAATGGTCAGTTACAACAGAA
TGGTGCTAATGGGATACCAGATCCTGATATTGATACAAGACCAGCATCCACTGCAGATCCAGACAAA
GTAAATTTTAAAAATGGACGAGTGTCTCTACAGATAAAAGTGACAAAGATGAAAAAGATAAAGATAA
AGATAAAGAGAAGAAAGAACCAGAAAAAATGGTCGGCTTCTTTGAAGTGTTTAAATTCTCCACATGT
GTAGACAAGTTACTGATGATTTTTGGTTCCATCTTTGCCTTGGCCCACGGAGCAGCATTACCAGCTA
TGATTATTGTGTTGGAGACATGACAGATTTGTTGTAGAATCAGGGATGTTGAACAATTTTAAACG
ATATTAGAAGTTATTTACCTACACTTGGATACACATACGATCAAGTCTACGACAATCCTTTATTACTGA
ATAATAACCGCACAGCAATTCAAGCACAATTGAACTATACTATTGACTGGAATGGCTTGAAGTCCA
```

continúa...

4. Resultados

```
AGATGAACTCCTGGATCAAATGAAAACATTTGCATTATATTACATAGCCATAGCTGGTGGTGTATGGT
ATGTGGCTACGTCCAGGTCAGTTTTTGGGCAGTTGCAGCTGAGAGACAAGCACACAGAATAAGGG
ACATGTTTCTACGAAATGTTCTTAGACAAGAGATTGGATGGTTTGATACACATGAGACAGGAGAACT
CAACACTCGTTTATCAGATGACATCAATAAGATTCATGAAGGTATTGGTGACAAGATGGGTTCTGTG
TACAGTGGACCTCTGGTTTCCTGACTGGATTATCATTGGATTCATATATGGGTGGAAACTTACCTTG
GTTATATTGGCCATCAGTCCTTTATTAGCTGTTACAGGATTTGTAATGAATAAGCTTGTAGCAGACATG
TCTTCTAAAGAATCTGAAGCTTATGCTAAAGCAGGGGCCATTGCAGAGGAAGTATTTAGTTCTATTAG
AACAGTGGTCAGTTTTTGGTGGACAGCAAAGGAATGCCAAAGGTACAATCCCACCTACAGACTGC
CAAGGATGTTGGTATTAAGAAGGGTTATACTAATGGCTTTTCTGTGGGATTAGTATATGTTGTTATGTT
GGAGCCTATGCTCTTGGGTTTTGGTATGGAGCCAAACTGGTTAGAGAGGAATCTGACACCTACACC
ATTGGAAAAGTTTTGATTATATTTTTCTCTGTTTTGATTGGTGCGTGGTCCATTGGTAATGTTGCTCCA
CCAC
```

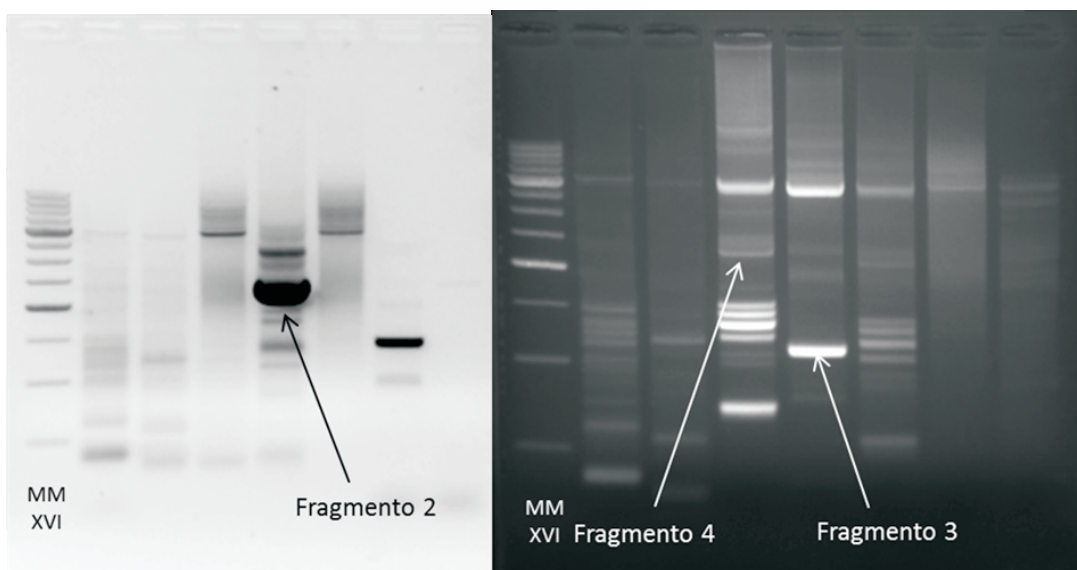


Fragmento 1

4. Resultados

Fragmento 2 (Race 3'- MDR2 qRT Fw) 1082 pb (6 clones)

```
GAGCCAAACTGGTTAGAGAGGAATCTGACACCTACACCATTGGAAAAGTTTTGATTATATTTTTCTCT
GTTTTGATTGGTGCCTGGTCCATTGGTAATGTTGCTCCACCACTTCAATCATTGGCATCGGCCAGGG
GAGCAGCTTTTGTGCTTTGACATCATAAAATTGGTTCCAGAGATTGACAGCTATTCTGAAGAAGGA
TCAAAGCCTGACAAGGTGACAGGAAATATACAGTTCAGGAATGTAAATTTACCTATCCTGCTAGGA
AGGAAGTACAGGTTTTGAAGGTGTGGACCTTACTGTACAACCTGGTCAGACAGTGGCCCTGGTAG
GATCAAGTGGGTGTGGTAAAAGTACATGTGTACAGTTAATGACCAGATTTTACGACCCAGAAGGAGG
AACTATTACTCTGGATGAAAATAATCTGAAGGATTTAAATGTGAAATGGTTGAGAGAACATATTGGTAT
TGTCAGCCAGGAACCAATCTTGTGGCCATGTCAATCAAAGATAATATAAGAATGGGACGGAATAATG
TTACTGATGATGAAGTCATTGCAGCCACCAAATGGCTAATGCTTACAACCTTATAATGGATCTCCCT
GAAAATTTGATACATTAGTTGGTGAGAGAGGAGCCCAGCTTAGTGGGGGACAAAACAGAGAGTG
GCCATTGCTAGAGCACTTGTACGAGATCCAAAATACTTCTTCTTGATGAAGCTACTTCAGCCCTAG
ACACAGAAAGTGAGTCCATAGTACAGGAAGCTTTAGACAAAGCTAGAGCAGGTAGAACAACACTAG
TTATTGCTCATAGACTTTCCACCATCAAAAACGCTGATATTATTGCTGGCTTTAAGGAGGGTGTGATT
GTAGAACAAGGAACTCATGATCAACTGATGGCTAAGAGTGGAGTCTATAACTCACTTGTGACACTAC
AGACAAAGAAAGTAGATGTAGAAGTTGAGGCAGAAGAGGAAGAATTAATAAAGGAATACACAGAAG
GAATTAAGATACAGACAAGAAGAATTACACCGTGGGATGTCTACTTTATCAGATGGCAAATCGGC
AGCTCTA
```



Fragmentos 2, 3 y 4

4. Resultados

Fragmento 3 (Race 3'- MDR2 Race3' Fw2) 475 pb (5 clones)

TCGTTATAATGCTCCTGAATGGCCATTTATTTGGTTGGATGTATTGCTGCATGTTTGAATGGTGGAGT
TCAGCCAGCATTGCTGTCATCTTTGCAGAATTAATCGGAGTTTTGCAGAACAAGATCCAGACAAA
CAGGAAAAAGAAGTTCTAATGTATTGTTGATATTACTTGGTATTGGTGTAGCAGGTTTCATAGGATTC
TTTTACAGGGTGCCATGTTGGTAGATCTGGAGAAAACCTTGACCATGAGAATCAGAAAAATACATT
CAGGGCAATGATTAGACAGGATATATCCTGGTATGATGATCATAAGAATTCTACAGGAGCTCTAACTA
CAAGACTGGCAGTTGATGCTTCTCAAGTACAAGGGGCTGCTGGTGCCAGACTGGGTAGCTTGGTA
CAAAACATTGCTAACATGGGAACAGCACTGGTTATTTCTTTATCTATGGATGGCAACTTACTCTTGT
T

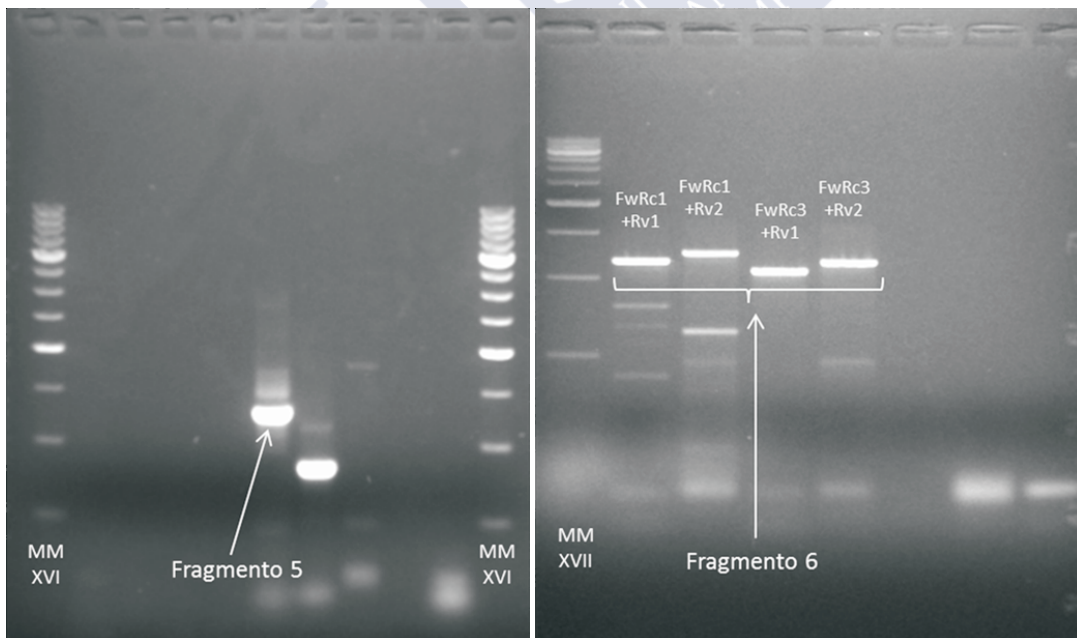
Fragmento 4 (Race 3'- MDR2 Race3' Fw1) 850 pb (7 clones)

AAGAAGGGAGAAGAGGAAGAAAAGGAAAAGAAACCTGATGTAGGATTTGGTCGAATTATTCGTTATA
ATGCTCCTGAATGGCCATTTATTTGGTTGGATGTATTGCTGCATGTTTGAATGGTGGAGTTCAGCCA
GCATTGCTGTCATCTTTGCAGAATTAATCGGAGTTTTGCAGAACAAGATCCAGACAAACAGGAAA
AAGAAGTTCTAATGTATTGTTGATATTACTTGGTATTGGTGTAGCAGGTTTCATAGGATTCTTTTTACA
GGGTGCCATGTTGGTAGATCTGGAGAAAACCTTGACCATGAGAATCAGAAAAATACATTCAGGGCA
ATGATTAGACAGGATATATCCTGGTATGATGATCATAAGAATTCTACAGGAGCTCTAACTACAAGACT
GGCAGTTGATGCTTCTCAAGTACAAGGGGCTGCTGGTGCCAGACTGGGTAGCTTGGTACAAAACAT
TGCTAACATGGGAACAGCACTGGTTATTTCTTTATCTATGGATGGCAACTTACTCTTGTTATCATTG
CATTCTTGCCTGCCATTGCTGTGGGTGGAGCTTACAGATGAAAATATTAATGGAGTTGCTGGGCA
AAATAAAGAAGCATTGGAGGAAGCAGGCAAATTTGCTACGGAGGGTGTGAAAATATACGGACAGT
AGCATCATTGACAAGGGAAGACAGGATACACGATATATATCTTGAAAGTCTAAGGGGACCATATAAG
GCTGCTCTTAAGAAAGCACATGTGGCAGGATTTGCTTCTCCTTCTCAATCTGTTATCTTCTTTGC
CTATGCTGGAGCTTCTTTTTTGGAGCGTACATGATCAAAG

4. Resultados

Fragmento 5 (MDR2 Fr Fw+MDR2 Fr Rv) 640 pb (7 clones)

```
TGGTGAGAGAGGAGCCCAGCTTAGTGGGGGACAAAAACAGAGAGTGGCCATTGCTAGAGCACTTG  
TACGAGATCCAAAATACTTCTTCTTGATGAAGCTACTTCAGCCCTAGACACAGAAAGTGAGTCCAT  
AGTACAGGAAGCTTTAGACAAAGCTAGAGCAGGTAGAACAACACTAGTTATTGCTCATAGACTTTCC  
ACCATCAAAAACGCTGATATTATTGCTGGCTTTAAGGAGGGTGTGATTGTAGAACAAGGAACTCATG  
ATCAACTGATGGCTAAGAGTGGAGTCTATAACTCACTTGTGACACTACAGACAAAGAAAGTAGATGT  
AGAAGTTGAGGCAGAAGAGGAAGAATTAATAAGGAATACACAGAAGGAATTAAGATAAGACAAG  
AAGAAATTACACCGTGGGATGTCTACTTTATCAGATGGCAAATCGGCAGCTCTAGAGAAAACAAGAAAT  
CTGTGACCGATAAAAAGAAAAAGAAGAAAGAAAGAAAGGGAGAAGAGGAAGAAAAGGAAAAGAAA  
CCTGATGTAGGATTTGGTCAATTATTCGTTATAATGCTCCTGAATGGCCATTATTTGGTTGGATGT  
ATTGCTGCATGTTTGAATGGTGGAGTTCAGCCAGCATT
```



Fragmentos 5 y 6

4. Resultados

Fragmento 6 (MDR2 Race3' Fw1 & Fw3+MDR2 Rv1 & Rv2) 1161-1249 pb (8 clones)

AAGAAGGGAGAAGAGGAAGAAAAGGAAAAGAAACCTGATGTAGGATTTGGTCGAATTATTCGTTATA
ATGCTCCTGAATGGCCATTTATTTGGTTGGATGTATTGCTGCATGTTGAATGGTGGAGTTCAGCCA
GCATTTGCTGTCATCTTTCAGAATTAATCGGAGTTTTGCAGAACAAGATCCAGACAAACAGGAAA
AAGAAGTTCTAATGTATTGTTGATATTACTTGGTATTGGTGTAGCAGGTTTCATAGGATTCTTTTTACA
GGGTGCCATGTTGGTAGATCTGGAGAAAACCTTGACCATGAGAATCAGAAAAAATACATTAGGGCA
ATGATTAGACAGGATATATCCTGGTATGATGATCATAAGAATTCTACAGGAGCTCTAACTACAAGACT
GGCAGTTGATGCTTCTCAAGTACAAGGGGCTGCTGGTGCCAGACTGGGTAGCTTGGTACAAAACAT
TGCTAACATGGGAACAGCACTGGTTATTTCTTTATCTATGGATGGCAACTACTCTTGTTATCATTG
CATTCTTGCCTGCCATTGCTGTGGGTGGAGCTTTACAGATGAAAATATTAATGGAGTTGCTGGGCA
AAATAAAGAAGCATTGGAGGAAGCAGGCAAATGCTACGGAGGGTGTGAAAATATACGGACAGT
AGCATCATTGACAAGGGAAGACAGGATACACGATATATCTTGAAAGTCTAAGGGGACCATATAAG
GCTGCTCTTAAGAAAGCACATGTGGCAGGATTTGCTTTCTCTCTCAATCTGTTATCTTCTTTCG
CTATGCTGGAGCTTTCTTTTTGGAGCGTACATGATCAAAGAAAGGAAATGGACTTTGTTGATGTTT
TTAAGGTATTTCTGCCATTGTGTTTGGAGCTATGGCTTTAGGACAGGCCAGTGCATTTGCACCAGA
TGCAGCTAAAGCCCAGGCCTCATCAGAAGTTATCTCCCTTTGTTGGATAACAACCAACCATTGAT
GCTGAGTCTGATAAAGGAGAGAAACCACATGCTGAAACAGTAACCAGTACTGTCACATTTAGAGAC
TGCAAGTTCAGGTACCCTACTCGACCAGATGTTGAGGTCTACAGGGATTGACATTGACGGTAGAT
CCAGGACAGACACTGGCATTAGTGGGGACCAGTGGATGTGGAAGTCAACTACAGTTGCCCTGAT
TGAAAGATTTTATGACGTAGAAGCAGGATCTGTGTGCTTG

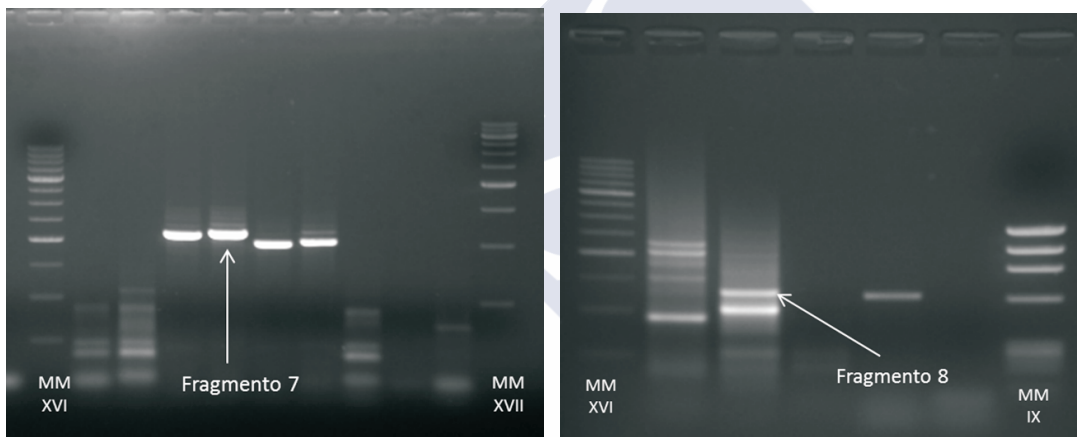
Fragmento 7 (MDR2 Rc 3'Fw4 +MDR2 Ultimo 2 Rv) 1117 pb (6 clones)

GTGTTTGGAGCTATGGCTTTAGGACAGGCCAGTGCATTTGCACCAGATGCAGCTAAAGCCCAGGC
CTCATCAGAAGTTATCTCCCTTTGTTGGATAACAACCAACCATTGATGCTGAGTCTGATAAAGGA
GAGAAACCACATGCTGAAACAGTAACCAGTACTGTCACATTTAGAGACTGCAAGTTCAGGTACCCT
ACTCGACCAGATGTTGAGGTCTACAGGGATTGACATTGACGGTAGATCCAGGACAGACACTGGCA
TTAGTGGGGACCAGTGGATGTGGAAGTCAACTACAGTTGCCCTGATTGAAAGATTTTATGACGTAG
AGGCAGGATCTGTGTTGCTTGATAAGTATAACGTGAAAGATCTGAATGTACCATGGTTACGATCTCAG
ATCGGAATTGTATCCAGGAACCCATATTATTTGACTGTAGTATCAGAGACAATATTGCTTATGGTGA
CAACAGCCGAACCAAGTATGGACGAGATAATCAAAGCTGCTAGGAACGCTAACATTATGAAATTT
ATATCATCTTTACCAGATGGTTATGACACTAATGTTGGTGACAAGGGGACACAACCTGAGTGGTGGAC
AGAAACAACGTGTAGCTATTGCCAGAGCTTTGTTACGTAATCCAAGGATCTTACTTATGATGAGGC

continúa...

4. Resultados

```
TACATCTGCTCTAGATACAGAAAAGTGAAAAGATTGTACAAGAAGCTTTAGACAAGGCCAGAGCGGG
CAGAACATGTATTGTTATTGCCATAGATTATCAACCATACAGAATGCTGACAAGATTTGTGTGATTAA
ACATGGTACTGTCAGTGAAGAAGGAAAACACAATGATCTTATGGCCAAACAGGGAATTTATTACAAG
TTGAATATGGCACAGAAACGACAGAAATAAACCTTCTTACTTTATCCCTCATTGTGAAAATTTGTGA
TTATATTTAACTAAAAGGAAACATTTTCCTTATTCTTACATTGTAATGATTGTAATGTAATATAGTGATC
AACTAGGAGCTGTGAAGTATAAAATGAAAGTTGAAGTTTTTTTTGTAGTTTATCATGTGAAAGAGAA
GTTAATAGATGGTTAATAAAGTGCTGTGATTGTAAGTGC
```



Fragmentos 7 y 8

Fragmento 8 (Race 3'- MDR2 Fin Rc3') 591 pb (1 clon)

```
AGCTGCTAGGAACGCTAACATTCATGAATTTATATCATCTTTACCAGATGGTTATGACACTAATGTTGG
TGACAAGGGGACACAACCTGAGTGGTGGACAGAAACAACGTGTAGCTATTGCCAGAGCTTTGTTACG
TAATCCAAGGATCTTACTCTTAGATGAGGCTACATCTGCTCTAGATACAGAAAAGTGAAAAGATTGTAC
AAGAAGCTTTAGACAAGGCCAGAGCGGGCAGAACATGTATTGTTATTGCCATAGATTATCAACCAT
ACAGAATGCTGACAAGATTTGTGTGATTAACATGGTACTGTCAGTGAAGAAGGAAAACACAATGAT
CTTATGGCCAAACAGGGAATTTATTACAAGTTGAATATGGCACAGAAACGACAGAAATAAACCTTCTT
ACTTTATCCCTCATTGTGAAAATTTGTGATTATTTAACTAAAAGGAAACATTTTCCTTATTCTTAC
ATTGTAATGATTGTAATGTAATATAGTGATCAAACCTAGGAGCTGTGAAGTATAAAATGAAAGTTGAAGG
TTTTTTTTGTAGTTTATCATGTGAAAGAGAAGTTAATAGATGGTTAAT
```

4. Resultados

Algunos fragmentos obtenidos y un gran número de los clones que se enviaron a secuenciar resultaron ser secuencias de las que no se obtuvieron los resultados esperados (ya que no se encontraban campos abiertos de lectura, o presentaban un parecido elevado con otros genes distintos) y, en algunos casos, estaban “sucias” (los picos de los cromatogramas recibidos no eran claros, por lo que no es posible designarle ningún nucleótido y la secuencia final no se podía obtener). Por tanto, estos clones tuvieron que ser descartados y no se pudieron utilizar para la obtención de las secuencias finales.

Finalmente, los clones de todos los fragmentos fueron ensamblados (CAP), obteniéndose una secuencia de cDNA de 4271 pb, que contienen la región codificante completa para la proteína MDR1/ABCB1 en mejillón, mientras que para la MDR2/ABCB2 fue de 4417 pb. Los números de acceso en las bases de datos para su localización son: FM999809 y HF912273, respectivamente.

El marco de lectura abierto de las secuencias de *mdr1* y *mdr2* se estudió usando la herramienta informática *ORF Finder (Open Reading Frame Finder, NCBI)*. *Mdr1* presentaba un marco abierto de lectura de 3924 pb, codificando para una proteína de 1307 aminoácidos y con un peso molecular de 143.91 kDa, calculado por el programa en línea *Protein Molecular Weight Calculator* (<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>).

Se basa en un cálculo obtenido al sumar los pesos atómicos individuales de los átomos que componen los aminoácidos presentes, pero no tiene en cuenta ciertas modificaciones que se producen en las proteínas y que hacen variar el peso molecular como, por ejemplo, la glucosilación. Las regiones 5' y 3' no traducidas contienen 189 pb y 161 pb, respectivamente. La secuencia del cDNA para la *mdr2* presenta 4104 pb, codificando para una proteína de 1367 aminoácidos, con un peso molecular deducido de 150,37 kDa. Las regiones no traducidas de esta proteína comprenden 117 pb hacia el lado 5' y 196 pb en el extremo 3'.

4. Resultados

> *mdr1* FM999809 (MDR1F, MDR1R2, MDR1F2, MDR1R, MDRMg-Fw, MDR End Nested 3)

```
GACTAGTTGATTTCAATTCCTTATGCAATAGCCAAATATAAATGATTACAAACTAGAGTTGCTTTAAATT
CGGATTTACAAGTCGACAAATAAAGTTCTGTACAGAGAGTTCCATTAGTCAGAGCTGGGACATAAT
TTATTGTTAGTATAGTAGTCCCAGGTCCGAGCGATATTTTGTATCAAGAAAATGAGTAAAAGCGAAG
AGAGAAAGCCTCTTCTGGGTGACGCAAGTGACGAGCAGGAATCCTACACAGACAAAGATAAGAAG
AAGGACAAAGAAAAGAAAAACCAGATGGACCTCCCCAGCCACACTGGGACAATTGTTCCGCTA
TGCTACGTGTGTGGACATAATCTGTATCCTGTTTGGTTCCCTGTTTTCACTTGCTCATGGAGCAGGA
TGGCCAGTTTTGTCCATTGTTATGGGTGAGATGACAGACACTTTTGTAGCAGGACCAAATGGATCAT
TGATACCTCCAGACCCTAATGCCACACACAATCCTAATGTTACTGTAGAATCTTTGAAGACAAGAT
GACGACATATGCATTATATTATTAATCATTGGTGGCGTAGTACTCCTCTCTGGTTATTACAGATCGC
ATGTTTTATGACAGCCTGTGAGAGACAAGTAAACAAGATTAGAAAACAATTTTCCAAGCTATATTAC
GACAGGAGATTGGCTGGTTTGATAAACATCAGAGTGGTGAAGTACAACCAGATTATCGGATGATTT
AGAAAGAGTGAGAGAAGGCATCGGAGACAAGCTAAGTCTTTTGATACAGTTCGTAGCTCAGTTTTTT
GCTGGATTTGCCATTGGATTTATAAAAGTTGGAATATGACGTTAGTTATGATGTCACACTGACACCTCTA
CTGGCCATTCTGGTGGTTATTTCTCAGGACTGATGCAAACTTTGCGAAAAGAGAACAAGCCTTAT
ATGCTGACGCTGGAAGTGTAGCAGAAGAAGTTATATCTTGATGAGAAGTGTGGTATCATTTAATGGT
CAAAACAGGAAGTAAAAGATACGGAAAATCTTTGGAAGAAACAAAACAATAGGGATAAAGAAAT
CCATGGTAACTGATTTGTGCTTGGTAGTTTATATCTTGTCATGTTTGGAGATTATGCACTGTCATTTT
GGTATGGAATGAACAAGTAAAAAATTCATAACATCTAACGGAGAAGATGGTATCACACCTGGTAC
AGTCTCACAGTATTTTTCTGTGTAATGATTGGTAGTTTCTCAATAGGAAATGCAGCACCAAACATTG
GTTCTTTGTAACAGCCAAAGGCGCTGCAGCTGTTGTGTATGAAATCATTGACAGAAAACCAAAT
AGATGCCAGTCTGAGAAAGGACAACGCCCACTGTCAATACAAGGAGCATTACAGTTTCTTGGTGT
GAATTTACTTATCCTACAAGAGAAGATGTACAGGTGCTGACTAATTTAACCTGTCGATAAAACCTG
GACAACTGTAGCTTTGGTAGGATCCAGTGGCTGTGGCAAATCTACCATAGTAAATCTCATACAGAG
GTTCTATGACCCAGATGCAGGACAAGTTTTACTTGATGGTAACAACATAAAAGATTTAAATTTGAACT
GGTTACGACAGAACATCGGTGTGGTATCGCAGGAACCAGTCTTGTGGCTGCACCATAGCCGAGA
ACATCCGACTAGGAATCCGAATGCAACCATTACAGAAATAGAACAAGCGCCAAACAAGCCAATG
CACATGACTTCATAAAAGTCTTCTCAGAGTTACAACACACTAGTTGGAGAGGCGTGGAGCTCAGT
TATCAGGAGGACAGAAACAACGAGTAGCCATTGCCAGAGCTTTGATTAGAGACCCAAGAATCCTAT
TGCTGGATGAAGCTACATCTGCATTAGACTCTGAGAGTGAGAACATTGTACAGGAAGCCCTAGAAA
AGGCAAGACAGGGAAGAACAACCTTGGTGATGCATCGTTTGTCCACCATACAGAAAGCAGAC
ATTATATATGTGGTGGATAAAGGAGAGATCATAGAACAGGGAACACATGGTGACCTGATGGACAAAC
AAGGACTGTATCATTACTGGTCACTGCACAGACATTGGTTAATGAAGATGCAGGATTTCAAATGA
GTGTGAGGACGCTGAGTTAGCACTAGATGAGGATGAGGAAGAGGAAGCCGCAGATGCTGTACCAG
ATCAAACAGTTAAACGACAAAGATCAAGAATCAAATCTACATCATCAGATGACAAATCACCACAAAA
ATTGCTCGACAACCTCTCCGACAGACATCAGGACTGTCTGATGGAAAGGACAAAGCTGAAAAAG
```

continúa...

4. Resultados

AGGAGGAGCCTGAAGAACAAGAAGAATATGAACCACCGAGGTACTCCGTATGATCCATGAAAATC
AACCAGAATGTGGATTTATTGTGCTTGGGATTATGGCATCTTGTGTCGCTGGATGTACGATGCCAGC
ATTTGCTATATTCTTTGGAGAAATGATTAAGGTATTCATAGAGCTTGGAAATAATGGTCTTTTATGGAGT
ATGATGTTTTGGCTCTCGGAGGAATTAATTTCTGGTCTATTTTGTACAGGCTTCTAGTTTTGGTATAT
CTGGTGAGAGACTGACCCAGCGTCTCAGGCTCGGTACATTTAATGCCTACATGAGACAAGATATAG
CTTTCTATGATGACAAGTCCACTCTACAGGAGCTCTAACCAACCAGACTGGCTACAGATGCATCCTT
AGTAAAAACAGCAACAGGTGTGAGAATTGGAATGGTTTTCCAGTCAATGTTTGGACTG**GTAGCAGC**
CCTGGTTATAGCCTTCTATTATGGGTGGGCTCTAGCTCTTGTGTACTTGGCATTGTACCAATAATTG
GTTTTGCAAGTAGCCTACAGATAAAAAGTTTTAAAGGGAAGACATGAGGAAGATAAAGGAAAAGTAGA
GGAGGCTGGGAAGACAGCTGCAGAACTATTGAGAATATCAGAACTGTCCAGTCCTTGACCACAG
AGAAACATTTCTATCACGAATATTCGCATTCTCTTGTGGGACCACTCAGATCCATGATAAAGCAAGC
CCACTGGTATGGTATAGCATTGGTTTAGGTCAAGGTGTTATCTTCATGACCTATGCTGGTGCCTTTA
GATTTGGTGCCTGGCAAGTGGAGATAGGAGAAATGACAGCTGATAATGTGTTCAAGGTGTTCTTTGC
CATTGCCTTCACTGCCATGGTATTGGACAATCATCCTCATTCTGCCAGAGTATTCAAAGGCCAAA
CATGCTGCTGGATTGATTTCAAAGCATTGGACACTGTACCATCTATAGATATACTCCAAAAGAGG
AACGTATCTGCAAAAAGTGGATGGTTTGATACAGTTAAAGATGTCAATTTCTGTTACCCAAGTAGAC
CAGAGGTAAAGGTCTTGAAGGGAGTGAATATGAAGGTGGAGCCAGGACAGACTGTGGCTCTTGTG
GGACAAAGTGGGTGTGGCAAGTCTACAGTTATCTCCCTTTACAGAGATTCTATGATCCTGAGTCAG
GGGAAATTATGATAGATGGTATAGATATAAAAGACCTACATCTTCACAAAATGAGGTCATTTATTAGCG
TGGTCAGTCAGGAACCGATCCTGTTAATTGTAGTATCAGTGACAACATAGCTTATGGTCTGGAGGA
AACTGCAGGGATGGATGATGTTATTGCTGCTGCTAGAGATGCTAATATTGATGATTTACTAGTCA
GCCAATGGGTTATGACACAATAGTTGGTGAGAAGGGGACACAAGTCTGGTGGACAGAAGCAGC
GTGTTGCCATAGCAAGAGCTTTGATTAGAAATCCCAAATTTCTCTGTTAGATGAGGCTACATCAGCA
TTAGATTCAGAGAGTGAAAAGTTGGTACAAGAAGCATTAGACAAAGCACAAGAAGGTCGTACATGTA
TTGTGATAGCCCATCGTCTTTTACGATTCAGAATGCTGATGTGATCTTTGTAATGGACAGTGGCGCC
ATC**GTAGAAAGTGGTACACACCAGACTC**TTTTAGCGAAGAAAGGAGTGACAATTCCTTAGTTAGTG
CACAGCAGTTTATAAAA**TAG**TATTTAACATATATTAGGATTTTTTAATTTGTTTACTTTTTAAAATTT
ATATTATGTAAAATAAGGTC**ACTTGACCTC**ATTTTCAGGATTTTTGTT**CATACTCCAGT**ATAAAAATTTG
GATGAATCAGTTTACTAAATGTATTAATAATATAAA

Figura 39a. Secuencia nucleotídica completa de *mdr1* de *M. galloprovincialis*. Las zonas en *itálica* corresponden a las regiones 5' y 3' no traducidas. Los cebadores usados están marcados con distintos colores. Codón iniciación Met en subrayado doble. Codón de terminación Stop en letra sobre fondo gris. Subrayados, los cebadores empleados en la RT-qPCR. En colores, la localización de los distintos cebadores usados para la obtención de los fragmentos.

4. Resultados

>mdr2 (MDR2Start-R3'F, MDR2qRT Fw&Rv, MDR2Fr-Fw, MDR2Race3'Fw1, MDR2Race3'Fw2, MDR2Race3'Fw3, MDR2Fr-Rv, MDR2Race3'Fw4, MDR2-Rv1, MDR2-Rv2, MDR2FinR3' Fw).

```
GTACGTCAACAACCTGGAGGGAGATATATAAAGGTTGGATTCCACGGTTATCTAATTTGGATTAGCCA
AACATATCAAAACCATATATGCTTTTGTGAAAATTAGAGTAAAGAGTTATGCCAGAACCAGAATTATT
GGGATATAAGCCTACAGCTACAGAAGGAAATGGTCAGTTACAACAGAATGGTGCTAATGGGATACCA
GATCCTGATATTGATACAAGACCAGCATCCACTGCAGATCCAGACAAAGTAAATTTAAAAATGGAC
GAGTGTCTCCTACAGATAAAAGTGACAAAAGATGAAAAAGATAAAGATAAAGATAAAGAGAAGAAAGA
ACCAGAAAAAATGGTCGGCTTCTTTGAAGTGTAAATTTCCACATGTGTAGACAAGTTACTGATGA
TTTTGGTTCCATCTTTCCTTGGCCACGGAGCAGCATTACCAGCTATGATTATTGTGTTGGAGA
CATGACAGATTTGTTGTAGAATCAGGGATGTTGAACAATTTTAAACGATATTAGAAGTTATTACCT
ACACTTGGATACACATACGATCAAGTCTACGACAATCCTTTACTGAATAATAACCGCACAGCAAT
TCAAGCACAATTGAACTATACTATTGACTGGAATGGCTTGAAGTCCAAGATGAACTCCTGGATCAA
ATGAAAACATTTGCATTATATTACATAGCCATAGCTGGTGGTGTATGGTATGTGGCTACGTCCAGGT
CAGTTTTTGGGCAGTTGCAGCTGAGAGACAAGCACACAGAATAAGGGACATGTTTCTACGAAATGT
TCTTAGACAAGAGATTGGATGGTTTGATACACATGAGACAGGAGAACTCAACACTCGTTTATCAGAT
GACATCAATAAGATTCATGAAGGTATTGGTGACAAGATGGGTTCTGTCTACAGTGGACCTCTGGTT
TCCTGACTGGATTTATCATTGGATTCATATATGGGTGGAACCTTACCTGGTTATATTGGCCATCAGTC
CTTTATTAGCTGTACAGGATTTGTAATGAATAAGCTTGTAGCAGACATGTCTTCTAAAGAATCTGAAG
CTTATGCTAAAGCAGGGGCCATTGCAGAGGAAGTATTTAGTTCTATTAGAACAGTGGTCAGTTTTGGT
GGACAGCAAAAGGAATGCCAAAGGTACAATCCCACCTACAGACTGCCAAGGATGTTGGTATTAAG
AAGGGTTACTAATGGCTTTTCTGTGGGATTAGTATATGTTGTTATGTTTGGAGCCTATGCTCTTGGG
TTTTGGTATGGAGCCAACTGGTTAGAGAGGAATCTGACACCTACACCATTGGAAGTTTTGATTAT
ATTTTTCTCTGTTTTGATTGGTGCCTGGTCCATTGGTAATGTTGCTCCACCACCTTCAATCATTGGCAT
CGGCCAGGGGAGCAGCTTTTGTGCTTTGACATCATAAAATTGGTTCCAGAGATTGACAGCTATTC
TGAAGAAGGATCAAAGCCTGACAAGGTGACAGGAAATATACAGTTCAGGAATGTTAAATTTACCTAT
CCTGCTAGGAAGGAAGTACAGGTTTTGAAGGTGTGGACCTTACTGTACAACCTGGTCAGACAGTG
GCCCTGGTAGGATCAAGTGGGTGTGGTAAAAGTACATGTGTACAGTTAATGACCAGATTTTACGACC
CAGAAGGAGGAACCTACTCTGGATGGAATAATCTGAAGGATTTAAATGTGAAATGGTTGAGAGAA
CATATTGGTATTGTCAGCCAGGAACCAATCTGTTTGCATGTCAATCAAAGATAATAAGAATGGG
ACGGAATAATGTTACTGATGATGAAGTCATTGCAGCCACCAAATGGCTAATGCTTACAACCTTTATAA
TGGATCTCCCTGAAAAATTTGATACATTAGTTGGTGAGAGAGGAGCCAGCTTAGTGGGGGACAAA
AACAGAGAGTGGCCATTGCTAGAGCACTGTACGAGATCCAAAAATACTTCTTCTTGATGAAGCTAC
TTCAGCCCTAGACACAGAAAGTGAGTCCATAGTACAGGAAGCTTTAGACAAAGCTAGAGCAGGTAG
ACAACACTAGTTATTGCTCATAGACTTTCCACCATCAAAAACGCTGATATTATTGCTGGCTTTAAGG
AGGGTGTGATTGTAGAACAAGGAATCATGATCAACTGATGGCTAAGAGTGGAGTCTATAACTCACT
TGTGACACTACAGACAAAGAAAGTAGATGTAGAAGTTGAGGCAGAAGAGGAAGAATTAATAAGGAA
continúa...
```

4. Resultados

TACACAGAAGGAATTAAGATACAGACAAGAAGAAATTACACCGTGGGATGTCTACTTTATCAGATG
GCAAATCGGCAGCTCTAGAGAAAACAAGAATCTGTGACCGATAAAAAGAAAAAGAAGAAAGGAAGA
AGGGAGAAGAGGAAGAAAAGGA^{AAAGAAACCTGATGTAGGATTTGGTCGAATTATCGTTATAATGC}
^{TCCTGAATGGCC}ATTTATTTGGTTGGATGTATTGCTGCATGTTGAATG^{GTGGAGTTCAGCCAGCAT}
^{TTGCTGTCACTTTGCAGAATTAATCGGAGTTTTGCAGAACAAGATCCAGACAAAACAGGAAAAAGA}
AGTTCTAATGTATTGTTTGTATTACTTGGTATTGGTGTAGCAGGTTTCATAGGATTTCTTTTACAGGGT
GCCATGTTTGGTAGATCTGGAGAAAACCTGACCATGAGAATCAGAAAAATACATTCAGGGCAATGA
TTAGACAGGATATATCCTGGTATGATGATCATAAGAATTCTACAGGAGCTCTAACTACAAGACTGGCA
GTTGATGCTTCTCAAGTACAAGGGGCTGCTGGTGCCAGACTGGGTAGCTTGGTACAAAACATTGCT
AACATGGGAACAGCACTGGTTATTTCTTTATCTATGGATGGCAACTTACTCTTGTATCATTGCATTC
TTGCCTGCCATTGCTGTGGGTGGAGCTTTACAGATGAAAATATTAATGGAGTTGCTGGGCAAATA
AAGAAGCATTGGAGGAAGCAGGCAAATGCTACGGAGGGTGTGAAAATATACGGACAGTAGCAT
CATTGACAAGGAAGACAGGATACACGATATATCTTGAAAGTCTAAGGGACCATATAAGGCTGC
TCTTAAGAAAGCACATGTGGCAGGATTTGCTTTCTCCTTCTCAATCTGTTATCTTTTGCCTATG
CTGGAGCTTTCTTTTGGAGCGTACATGATCAAAGAAAGGAAATGGACTTTGTTGATGTTTTAAG
GTATTTCTGCCATTGTGTTGGAGCTATGGCTTTAGGACAGGCCAGTGCATTTGCACCAGATGCAG
CTAAGCCCAGGCCCTCATCAGAAGTTATCTCCCTTTGTTGGATACAACCAACCATTGATGCTGA
GTCTGATAAAGGAGAGAAAACCACATGCTGAAACAGTAACCAGTACTGTCACATTTAGAGACTGCAA
GTTCAGGTACCCTACTCGACCAGATGTTGAGGTCCTACAGGGATTGACATTGACGGTAGATCCAGG
ACAGACACTGGCATTAGTGGGGACCAGTGGATGTGGAAAGTCAACTACAGTTGCCCTGATTGAAAG
ATTTTATGACGTAGA^{GGCAGGATCTGTGTTGCTTG}ATAAGTATAACGTGAAAGATCTGAATGTACCAT
GGTTACGATCTCAGATCGGAATTGTATCCAGGAACCCATATTATTTGACTGTAGTATCAGAGACAAT
ATTGCTTATGGTGACAACAGCCGAACCAAGTATGGACGAGATAATCAA^{AGCTGCTAGGAACGCT}
^{AACATTCATG}AATTTATATCATCTTACCAGATGGTTATGACACTAATGTTGGTGACAAGGGGACACA
ACTGAGTGGTGGACAGAAACAACGTGTAGCTATTGCCAGAGCTTTGTTACGTAATCCAAGGATCTTA
CTCTTAGATGAGGCTACATCTGCTCTAGATACAGAAAGTGAAGGATTGTACAAGAAGCTTTAGACA
AGGCCAGAGCGGGCAGAACATGTATTGTTATTGCCATAGATTATCAACCATACAGAATGCTGACAA
GATTTGTGTGATTAACATGGTACTGTCAGTGAAGAAGGAAAAACAATGATCTTATGGCCAAACAG
GGAATTTATTACAAGTTGAATATGGCACAGAAACGACAGAAA^{TAAACCTTCTACTTTATCCCTCATT}
^{TGTGAAAATTTGTGATTATTTAACTAAAAAGGAAACATTTTCTTATTCTTACATTGTAATGATTGTAA}
^{TGTAATATAGTGATCAA}ACTAGGAGCTGTGAAGTATAAAATGAAAGTTGAAGTTTTTTGTAGTTTAT
CATGTGAAAGAGAAGTTAATAGATGGTTAATAA

Figura 39b. Secuencia nucleotídica completa de *mdr2* de *M. galloprovincialis*. Las zonas en *italica* corresponden a las regiones 5' y 3' no traducidas. Los cebadores usados están marcados con distintos colores. Codón iniciación Met en subrayado doble. Codón de terminación Stop en letra sobre fondo gris. Subrayados, los cebadores empleados en la RT-qPCR. En colores, la localización de los distintos cebadores usados para la obtención de los fragmentos.

4. Resultados

El análisis de la secuencia de aminoácidos se llevó a cabo con el programa online Prosite (<http://ca.expasy.org/prosite/>) y por el software que se puede encontrar en la página del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*): *Conserved Domain Database CDD search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). Ambos programas predijeron la existencia de una organización estructural característica de los transportadores ABCB, con la presencia de dos partes. En cada una de ellas se pueden observar el dominio transmembrana (TMD) y el dominio de unión al nucleótido (NBD), donde pueden ser localizados los motivos característicos y altamente conservados de los transportadores ABC. Entre ellos, una región característica de los transportadores de la familia ABC, firma de las ABC o motivo C, en concreto el que identifica a la subfamilia ABCB: LSSGQKQRVA, además de otros motivos conservados, como *A-loop*, Walker A, *Q-loop*, Walker B, *D-loop* y *H-loop* (Figura 40, a continuación).

MDR1

```
MSKSEERKPLLGDASDEQESYTDKDKKKDKKPKDPGPPATLGQLFRYATCVDIICILFGSLFSLAHG
AGWPVLSIVMGQMTDTFVAGPNGSLIPDPNATHNPNVTVESFEDKMTTYALYYLIIGGVLLSGYLQI
ACFMTACERQVNKIRKQFFQAILRQEIGWFDKHQSGELTTRLSDDLERVREGIGDKLSLLIQVFAQFFAG
FAIGFYKSWNMTLVMMSLTPLLAILGGYFSGLMQNFQAKREQALYADAGSVAEEVISC MRTVVSFNGQ
KQEVKRYGKSL EETKQIGIKSMVTDLLLGS LYLV MFGDYALSFWY GNEQVKKFITSNGEDGITPGTVL
TVFFCVMIGSFSIGNAAPNIGSFVTAKGAAAVVYEIIDRKP KIDASSEKQRPLSIQGALQFLGVNFTYPT
REDVQVL TNFNLSIKPGQTV ALV GSSGCGKSTIVNLIQRFYDPDAGQVLLDGNNIKDLNLNWLRQNIGV
VSQEPV LFGCTIAENIRLGNPNATITEIEQA AKQANAHD FIKSLPQSYNTLVGERGAQLSGGQKQRVAIA
RALIRDPRILLLDEATSALDSESENI VQEALEKARQGR TTLVIAHRLSTIQKADIIYVVDKGEIIEQGTHGDL
MDKQGLYHSLVTAQTLVNEDAGFQNECEDAELALDEDEEEEAADAVPDQTVKRQRSRIKSTSSDDKSP
QKLSRQLSRQTSGLSDGKDKA EEEEEPEEQEEYEP RYFRMIHENQPECGFIVLGIMASC VAGCTMPA
FAIFFGEMIKVFIELGNNGLLWSMMFLALGGINFLVYFVQASSFGISGERLTQRLRLGTFNAYMRQDIAF
YDDKFHSTGALTTRLATDASLVKTATGVRIGMVFQSMFGLVAALVIAFYYGWALALVVLGIVPIIGFASSL
QIKVLKGRHEEDKGL EEAAGKTAETIENIRTVQSLTTEKHFYHEYSHSLVGLRSMIKQAHWYGI AFG L
GGQVIFMTYAGAFRFGAWQVEIGEMTADNVFKVFFAIAFTAMVIGQSSSFLPEYSKAKHAAGLIFKAFD
TVPSIDIYSKRGTYLQKVDGLIQKFDVNFYPT RPEVKVLKGVNMKVEPGQTV ALV GQSGCGKSTVISL
LQRFYDPESGEIMIDGIDIKDLHLHKMRSFISVVSQEPILFNCSISDNIAYGLEETAGMDDVIAAARDANI
HEFITSQPMGYDTIVGEKGTQLSGGQKQRVAIARALIRNPKILLLDEATSALDSESEKLVQEALDKAQEG
RTCIVIAHRLFTIQNADVIFVMDSGAIVESGTHQTL LAKKGVYNSLVSAQQFIK
```

4. Resultados

MDR2

MPEPELLGYKPTATEGNGQLQQNGANGIPDPDIDTRPASTADPKVNFKNGRVSPTDKSDKDEKDKD
KDKEKKEPEKMGVFFFEVFKFSTCVDKLLMIFGSIFALAHGAALPAMIIVFGDMTDLFVESGMFEQFLN
DIRSYLPTLGYTYDQVYDNPLLLNNNR^{TA}IAQAL^{NY}TIDWKWLEVQDELLDQMKT^{FALY}YIAIAGGVM
VCGYVQVSWAVAAERQAHRIRDMFLRNVL^{RQEIGW}FDTHETGELN^{RLSDD}INKIHEGIGDKMG^{SCL}
QWTSGLTGF^{IIGFIY}GWK^{LV}L^{VILAIS}P^{LLAVT}GFVMN^{KL}VAD^{MSSKESE}YAKAGAI^{AEEV}FSSIR^TVVS
FGGQQKECQRYN^{SHLQ}TAKDVGIK^{KGYT}NG^FSVGL^{VY}VMFGAYAL^{GF}WYGAKLVREES^DTYTIG^{KVL}
IIFSVLIGAW^{SIGN}VAPPLQSLASARGAA^{FV}VDII^{KL}VPEIDS^{YSEEG}SKPDKVTGNIQFRN^{VK}F^{TYPAR}
KEVQVLKGV^{DLTV}QPGQTVALV^{GSSGCG}KSTCV^{QLM}TRFYDPEGGTITLDGNN^{LKDL}NV^{KWL}REHIG^I
VSQEPILFAMS^{IKDN}IRMGRNN^{VT}DDEVIAAT^{KMAN}AYNFIM^{DL}PEKFD^{TLV}GERGA^{QL}SGG^{QK}Q^{RVAI}
ARALVRDPKILL^{DEATS}ALD^{TESE}SIVQEALDKARAG^RTTLVIAH^{RL}STIKNADIIAG^{FKEG}VIVEQ^GTHD
QLMAKSGVYNS^{LV}LQTKKVDVEVEA^{EEEE}LIKEYTEGI^{KD}TDK^{KKL}HRGMSTLDGKSA^{ALEK}QES^{VT}
DKKKKKK^{GK}G^{EEEE}E^{KEK}PDVGF^{GRI}RYNAPEW^{PFIL}VGCIA^{ACL}N^{GGV}QPAFAVIFAELIG^{VFAEQD}
PDKQE^{EV}L^{MYCL}ILLGIGVAG^{FIG}FFLQ^{GAM}FGRSGEN^{LT}MRIRK^NTFRAMIRQ^{DIS}WYDDH^KN^{STG}
ALTR^{LA}VDASQVQGAAGAR^LGSLVQNIANMG^{TAL}VISFIY^{GW}Q^{LT}L^{VIIA}FLPAIAVGGALQ^{MKIL}NGVA
GQNKEALEEAGK^{IATE}GVENIR^{TVAS}L^{TRE}DRIHDIY^{LES}LRGPYKAALK^{KAH}VAGFA^{SFS}SQSVIFF^{FAYA}
GAFFFGAYMIKEREMDF^{VD}VFKV^{FSAIV}FGAMALGQASAF^{APDA}AKAQASSEVIF^{PL}LD^{TT}P^{TIDA}ESD
KGEKPHAET^{VT}STV^{TR}FRDCKFRYP^{TR}PDVEVLQ^{GL}TL^{TV}DPGQTLALV^{GT}SGCG^{KST}TVALIER^FYDVE
AGSVLLDKYN^{VKDL}NVPW^{LR}SQIGIV^{SQEP}ILFDCSIRD^{NI}AYGDN^{SRT}PSMDEI^{IKAARN}ANIHE^FISSL
PDGYDTNVGDKGT^{QL}SGG^{QK}Q^{RVAI}ARALLRN^{PR}ILL^{DEATS}ALD^{TESE}KIVQEALDKARAG^{RTC}IVIA
H^{RL}STIQNADKICVIKHGT^{VSEEG}KHNDLMAKQGIYY^{KL}NMAQ^{KR}QK

Figura 40. Secuencias de las proteínas *mdr1* y *mdr2* de *M. galloprovincialis*. Las secciones subrayadas corresponden a hélices transmembrana ubicadas en el dominio de transmembrana (TMD). Los nucleótido-binding domains (NBD) contienen los motivos conservados que se muestran sombreados (por orden de aparición): *A-loop*, Walker A, *Q-loop*, firma ABC o motivo C, Walker B, *D-loop* y *H-loop*. Los potenciales lugares de N-glucosilación están resaltados con subrayado doble.

Un análisis adicional de las secuencias aminoacídicas (MDR1 y MDR2) se realizó utilizando el algoritmo Polyphobius (<http://phobius.sbc.su.se/poly.html>; Käll *et al.*, 2004), con el fin de diferenciar las regiones hidrófobas de las proteínas y así poder conocer su topología en relación a la membrana (Figura 41, en la página siguiente). Este análisis diferencia los segmentos transmembrana (altamente hidrofóbicos) de las regiones que están expuestas en la superficie de la proteína (dominios hidrofílicos). Se encontraron 12 segmentos (α -hélices, que atraviesan la bicapa lipídica, tanto en la MDR1 como en la MDR2.

4. Resultados

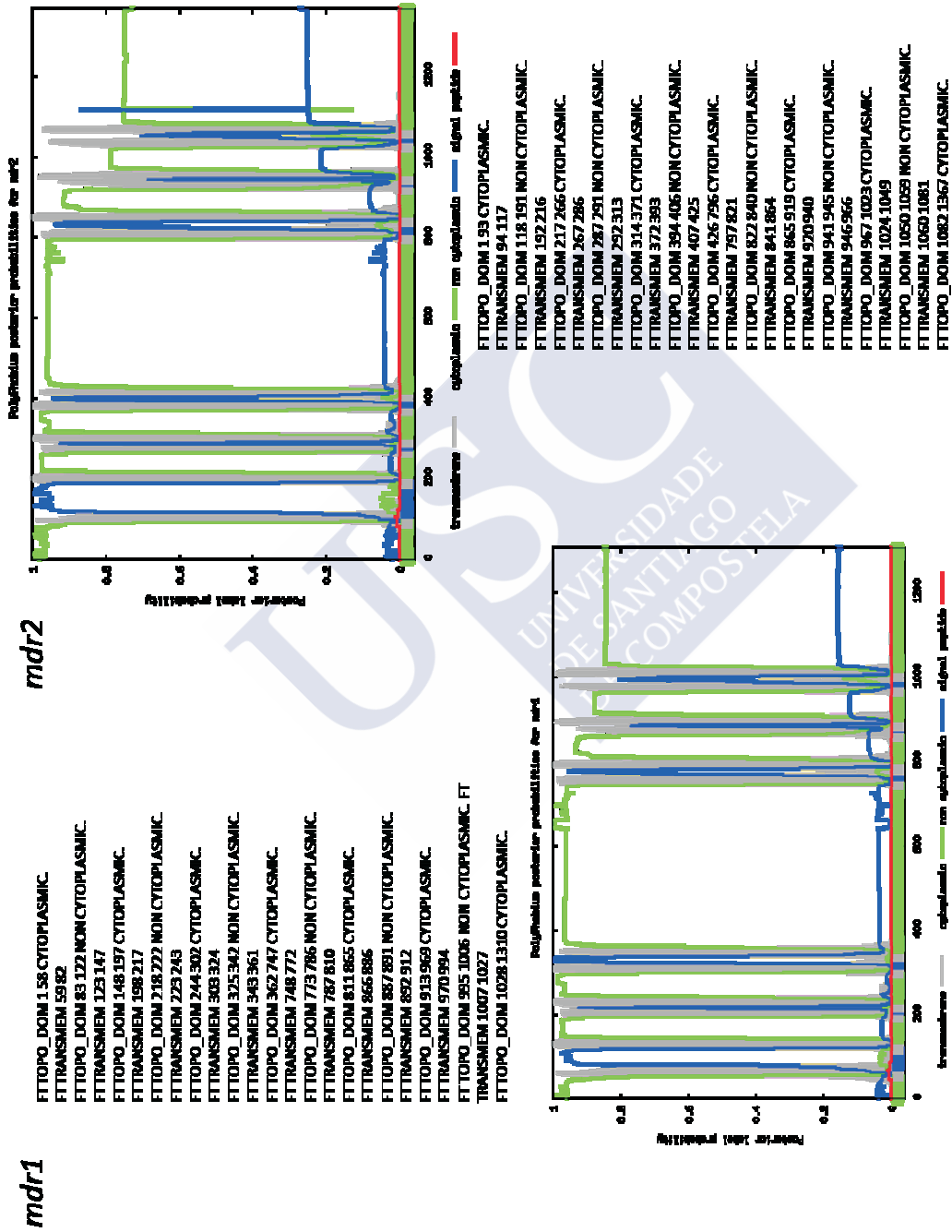


Figura 41 : Resultados obtenidos tras el análisis con Polyphobius, donde se marcan las zonas transmembrana, y se diferencian las regiones citoplasmáticas de las que salen al exterior de la célula.

4. Resultados

Cada TMD presenta seis hélices transmembrana, organización clásica de otros transportadores de la familia ABCB. En las proteínas transportadoras ABC con dos TMD, el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de la proteína están localizados hacia el citosol. La estructura y conformación de estas proteínas, así como la localización de las regiones y motivos más característicos, se pueden observar en la Figura 42.

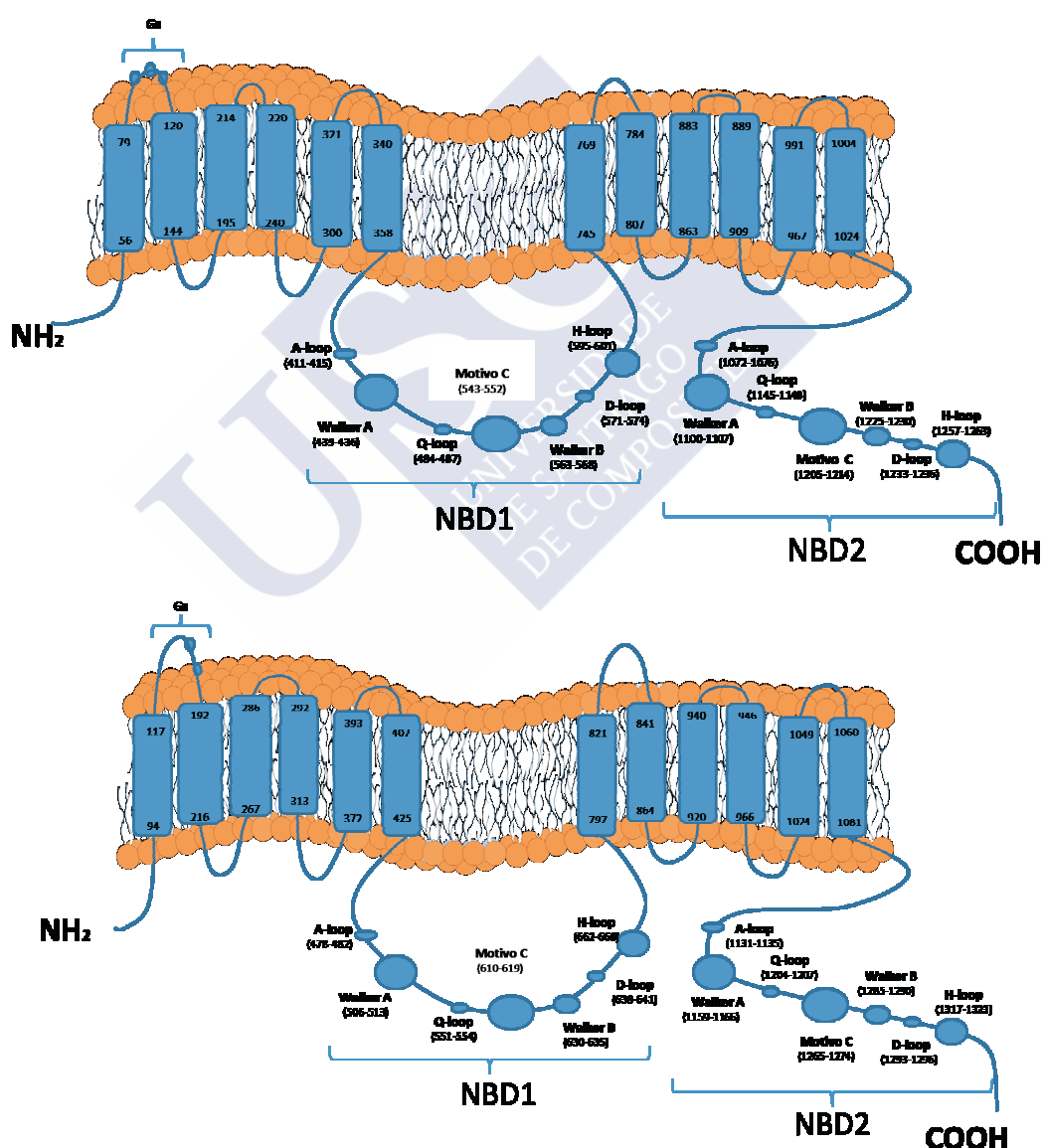


Figura 42: Estructura y topología en relación a la membrana de las proteínas MDR1 (arriba) y MDR2 (abajo), en *Mytilus galloprovincialis*. Gs: posibles zonas de glucosilación. Los números indican la posición de los aminoácidos, situados en las regiones señaladas.

4. Resultados

Para localizar las zonas de N-glucosilación de las proteínas se utilizó el programa *PP Search* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/ppsearch/>). Las características necesarias para encontrar estas regiones son que presenten la siguiente secuencia de aminoácidos: Asn-X-Thr/Ser (donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina). Además, debe estar en la región extracelular (Luckenbach & Epel, 2008). La MDR1 en mejillón contiene tres sitios posibles de N-glucosilación en las posiciones 91 (Asn-Gly-Ser), 100 (Asn-Ala-Thr) y 106 (Asn-Val-Thr), mientras que la MDR2 solo presenta dos posibles sitios de N-glucosilación en las posiciones 161 (Asn-Arg-Thr) y 170 (Asn-Tyr-Thr). En ambos casos, se encuentran en el bucle extracelular del extremo NH₂ del primer dominio transmembrana (TMD1).

El análisis de similitud de las secuencias fue realizado empleando las principales bases de datos de proteínas, *UniProt Knowledgebase*, con el programa EBI / BLASTP (Altschul *et al.*, 1997), utilizando la matriz Blosum62 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/ncbiblast/>). Los resultados también se compararon realizando un análisis similar con la base de datos NCBI y también fueron examinados usando el programa FASTA (Pearson & Lipman, 1988). La comparación de similitud de las secuencias peptídicas obtenidas reveló una elevada identidad y una gran similitud de la secuencia de aminoácidos con otras proteínas de resistencia múltiple frente a fármacos (MDR), tanto en moluscos bivalvos como en otras especies, confirmando su identidad como transportadores ABC de la subfamilia ABCB (Tabla 6).

Tabla 6: Identidad de las proteínas MDR en *M. galloprovincialis* frente a otras MDR de diversos organismos. Se emplearon los programas informáticos para el alineamiento de secuencias, BLAST y FASTA, sobre las bases de datos UniProt. Los análisis se llevaron a cabo, usando la matriz BLOSUM62. Accedido en octubre 2012.

	EBI: WU-BLAST		EBI: FASTA		NCBI: BLASTP	
	MDR1	MDR2	MDR1	MDR2	MDR1	MDR2
<i>Mytilus californianus</i>	91%	52%	94,9%	51,2%	95%	50%
<i>Homo sapiens ABCB1</i>	52%	57%	49,1%	56%	49%	56%
<i>Homo sapiens ABCB4/MDR2-3</i>	50%	56%	48,7%	55,2%	49%	55%
<i>Homo sapiens ABCB5</i>	47%	49%	46,8%		44%	48%

continúa...

4. Resultados

Tabla 6 (continuación)	EBI: WU-BLAST		EBI: FASTA		NCBI: BLASTP	
	MDR1	MDR2	MDR1	MDR2	MDR1	MDR2
<i>Homo sapiens ABCB11</i>	43%	51%	43,4%	47,1%	43%	47%
<i>Mus musculus ABCB1a</i>	51%	56%	49%	54,6%	49%	55%
<i>Mus musculus ABCB1b</i>	51%	56%	48,2%	54,3%	48%	54%
<i>Mus musculus ABCB4/MDR3</i>	51%	56%	48,2%	54,3%	49%	54%
<i>Mus musculus ABCB5</i>	46%	49%	42,8%	47,9%	43%	47%
<i>Mus musculus ABCB11</i>	42%	48%	43,1%	47,6%	42%	48%
<i>Rattus norvegicus ABCB1a</i>	52%	55%	49,9%	54,8%	49%	55%
<i>Rattus norvegicus ABCB1b</i>	52%	54%	48,4%	53,1%		53%
<i>Rattus norvegicus ABCB4/MDR2</i>	51%	56%	48,5%	47,4%	48%	47%
<i>Rattus norvegicus ABCB5</i>	46%	49%	43,4%			
<i>Rattus norvegicus ABCB11</i>	42%	47%	42,5%	47,2%	42%	47%
<i>Danio rerio ABCB4</i>		50%	48,6%	54,8%		
<i>Danio rerio ABCB5</i>	47%	52%	47,6%	51,4%	47%	52%
<i>Danio rerio ABCB11</i>	44%	50%	43,6%	50,7%	44%	50%
<i>Xenopus laevis ABCB1</i>	51%	56%	49,1%	55%	49%	56%
<i>Platichthys flesus ABCB1</i>	50%	52%	49%	53,7%	49%	54%
<i>Platichthys flesus ABCB11</i>	44%	49%	43,5%	50,5%	43%	50%
<i>Takifugu rubripes MDR</i>	50%	55%	47,5%	53,9%	49%	53%
<i>Takifugu rubripes MDR2</i>	52%	51%		50,4%	44%	50%
<i>Takifugu rubripes MDR3</i>	54%	53%		51,9%	46%	51%
<i>Takifugu rubripes MDR11</i>	43%	49%	42,7%	50,5%	43%	48%
<i>Oncorhynchus mykiss ABCB1</i>	51%	57%	46,8%	51,7%	47%	52%
<i>Oncorhynchus mykiss ABCB11</i>	43%	48%	42,9%	48,8%	43%	48%
<i>Ciona intestinalis MDR</i>	45%	51%	45,8%	49,1%	46%	51%
<i>Crassostrea gigas ABCB1</i>				51%	63%	61%
<i>Crassostrea ariakensis ABCB1</i>	45%	48%	45,9%	47,6%	46%	47%
<i>Brachidontes pharaonis ABCB1</i>		73%	41,30%	66,1%		79%

4. Resultados

Por tanto, en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, se puede describir la coexistencia de, por lo menos, dos transportadores de membrana homólogos, asociados a la P-glucoproteína (ABCB1/MDR1 codificada por *mdr1* y ABCB2/MDR2 codificada por *mdr2*). Comparten una identidad de aminoácidos, entre ellas, de aproximadamente un 50%. Las secuencias obtenidas fueron comparadas mediante WU-BLAST y se realizaron múltiples alineaciones de las secuencias con el servidor en línea ClustalW2 EBI.

Los resultados de las comparaciones se pueden ver en la Tabla 7, mientras que los alineamientos pueden ser consultados en el Anexo 8.2. El nombre de las proteínas ha sido designado por el orden en que han sido obtenidas. Esto es debido a que no podemos basarnos en los nombres dados a estas proteínas en otras especies, puesto que existe una elevada distancia filogenética entre el mejillón y los seres humanos u otras especies de las que ya se conoce el genoma completo.

Tabla 7: Puntuación de las comparaciones, por pares, de secuencias de proteínas MDR, obtenidas con el programa ClustalW. Reflejan el número de identidades entre las dos secuencias y se representa como un porcentaje. Mg: *M. galloprovincialis*; h: *Homo sapiens*; Mc: *M. californianus*; Cg: *C. gigas*; Ca: *C. arakinensis*.

SeqA	Name	Length	SeqB	Name	Length	Score
1	MgMdr1	1307	2	MgMdr2	1367	50.0
1	MgMdr1	1307	3	hABCB1/MDR1	1279	48.0
1	MgMdr1	1307	4	hABCB4/MDR3	1279	47.0
1	MgMdr1	1307	5	hABCB5	1257	44.0
1	MgMdr1	1307	6	hABCB11	1321	42.0
1	MgMdr1	1307	7	McABS83556.1M	1311	95.0
1	MgMdr1	1307	8	Cg_gi 405970698	1581	46.0
1	MgMdr1	1307	9	Cg 405970024	1296	63.0
1	MgMdr1	1307	10	Ca_AET34454.1	1333	43.0
2	MgMdr2	1367	3	hABCB1/MDR1	1279	56.0
2	MgMdr2	1367	4	hABCB4/MDR3	1279	56.0
2	MgMdr2	1367	5	hABCB5	1257	48.0

continúa...

4. Resultados

Tabla 7 (continuación)

2	MgMdr2	1367	6	hABCB11	1321	46.0
2	MgMdr2	1367	7	McABS83556.1M	1311	50.0
2	MgMdr2	1367	8	Cg_gj 405970698	1581	59.0
2	MgMdr2	1367	9	Cg 405970024	1296	47.0
2	MgMdr2	1367	10	Ca_AET34454.1	1333	46.0

4.2. Estudio filogenético de las proteínas MDR

Una vez fueron elegidas las secuencias que se querían analizar, se introdujeron en el programa Phylogeny.fr. Primero tuvo lugar un alineamiento y, a continuación, se seleccionaron las zonas más conservadas (*curation*). Finalmente, en base a los aminoácidos elegidos, se construyó el árbol filogenético. Las secuencias y los análisis empleados se explicaron en el apartado 3.3.13. *Análisis filogenético*.

Tras el análisis filogenético, se observa que las dos proteínas MDR se encuadran en lugares diferentes del árbol. Como se puede observar en la Figura 43 (ver página siguiente), la proteína que denominamos MDR1 se engloba en un cluster, muy próxima a la MDR de *M. californianus*: McABS83556.1, y en grupo con otras presentes en invertebrados marinos (*Lottia gigantea*: Lg153678 y *Crassostrea gigas*: Cg405970024).

Por otra parte, la secuencia de MDR2 también se agrupa con otras, obtenidas en bivalvos (*Brachiodontes faraoensis*: Bp_CA99869.1 y *Crassostrea gigas*: Cg405970698). De esta última especie también se encuentran secuenciados al menos dos genes *mdr* y se puede observar que están próximos a las distintas *mdr* de *M. galloprovincialis*, lo que podría indicar que nos encontramos con proteínas homólogas entre especies. Lo mismo ocurre con los genes *mdr* del molusco gasterópodo *L. gigantea*.

Es interesante destacar, por otra parte, que la secuencia analizada de *Crassostrea arakinensis* queda aislada de todas las demás. Esto nos hace suponer que, debido a la proximidad con los demás bivalvos y, especialmente, con *C. gigas*, la secuencia que se ha obtenido en esta especie podría ser una MDR distinta a

4. Resultados

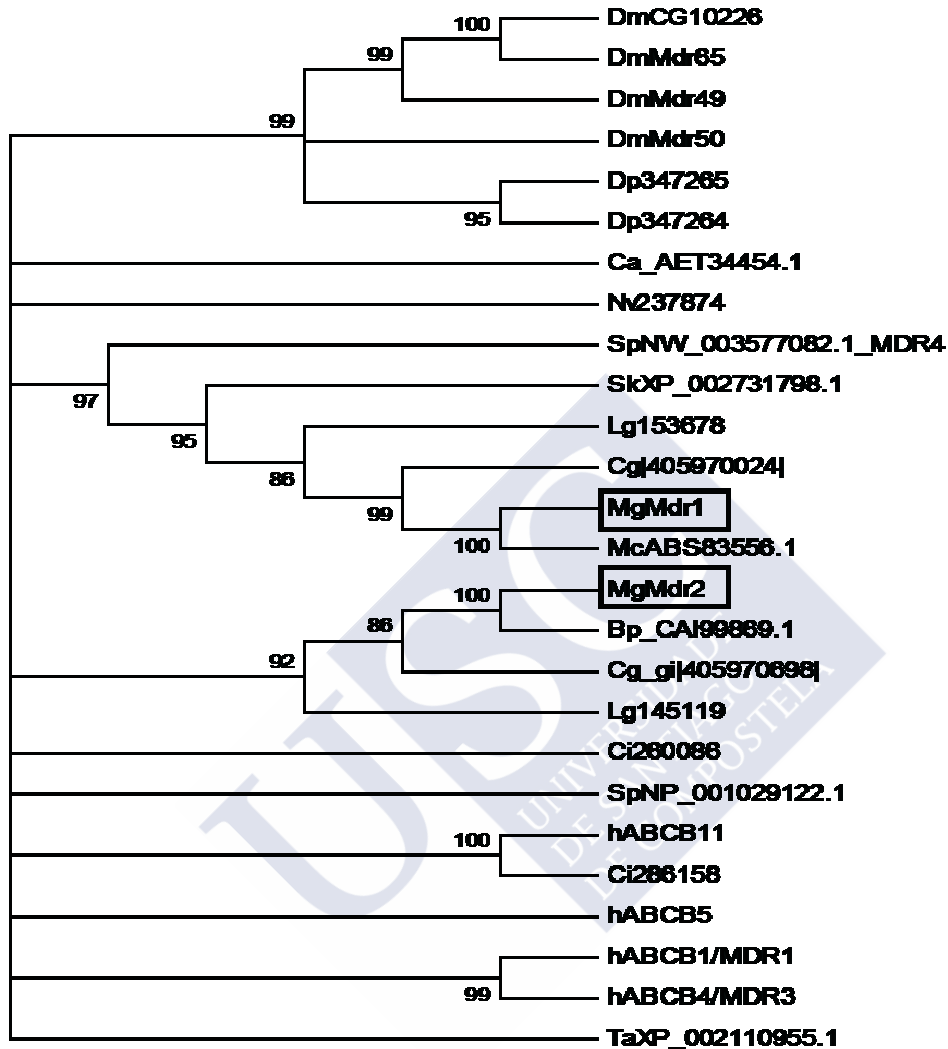


Figura 43. Árbol filogenético generado en MEGA, tras el análisis de la secuencias de proteínas MDR de diferentes especies. Mg: *M. galloprovincialis* (en cuadradas); H: *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*; Mc: *M. californianus*; Bp: *Brachidontes pharaonis*; Ca: *Crassostrea ariakensis*; Cg: *C. gigas*; Dp: *Daphnia pulex*; Ci: *Ciona intestinalis*; Lg: *Lottia gigantea*; Sp: *Strongylocentrotus purpuratus*; Sk: *Saccoglossus kowalevskii*; Nv: *Nematostella vectensis*.

Se usa una secuencia ABCB de *Trichoplax adherens* (Ta) para enraizar el árbol. La historia evolutiva se infiere utilizando el método de máxima verosimilitud, con 2000 réplicas de remuestreo basado en el modelo de matriz Jones-Taylor-Thornton (JTT). Se muestra el árbol con la probabilidad de registro más alto (-20621,7166), con el porcentaje indicado junto a las ramas de los taxones asociados y el colapso con valores menores al 85%. El árbol inicial se obtiene automáticamente de la siguiente manera: cuando el número de sitios comunes era <100 o menos de la cuarta parte del número total de sitios, se utilizó el método de máxima parsimonia; de lo contrario, se usó el método BIONJ con MCL distancia matriz. Una distribución gamma discreta se utiliza para modelar las diferencias evolutivas entre los diferentes sitios (8 categorías (distribución Gamma (G)= 1.4792)). El análisis incluyó 26 secuencias de aminoácidos con un total de 602 posiciones en el conjunto de datos final.

4. Resultados

las encontradas en esta investigación, lo que sugiere la existencia de, al menos, un tercer gen *mdr* en bivalvos.

Finalmente, debemos mencionar que especies del filo de los artrópodos, como la pulga de agua (*Daphnia pulex*) o la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), forman un cluster que se encuentran alejado en el árbol, debido a su distancia filogenética. Algo similar ocurre con las secuencias de *Homo sapiens*, que se localizan en un grupo distinto de los que forman los invertebrados marinos.

Para enraizar el árbol, se usó una secuencia ABCB del placozoo *Trichoplax adhaerens*, debido a que se ha considerado a esta especie una de los primeros animales en la escala evolutiva. Situado en la zona basal del filo de los metazoos, a los que pertenecen las demás especies que se han utilizado para el análisis, se consideró que podría ser utilizado como un ancestro común, con el cual enraizar el árbol.

4.3. Concentración de ácido okadaico en la glándula digestiva

Para conocer como afectaba la presencia de toxinas DSP, fueron enviadas unas muestras congeladas de glándula digestiva de todos los individuos al Grupo de Episodios Tóxicos del CIMA (Centro de Investigaciones Mariñas). Tras el análisis por HPLC MS/MS, de las muestras de glándula digestiva, se obtuvieron los valores de la concentración de ácido okadaico presente en cada muestra.

Los valores máximos de concentración se detectan en el muestreo de Bueu3, cuando los mejillones llevaban expuestos dieciséis días. Tras setenta y nueve en presencia de la marea tóxica, la concentración encontrada en los ejemplares desciende considerablemente.

Las muestras control (A Pobra do Caramiñal) mostraron valores indetectables por HPLC-MS/MS o niveles mínimos de concentración de toxina.

4. Resultados

La Tabla 8 refleja la concentración de ácido okadaico en las muestras:

Tabla 8. Concentración de ácido okadaico (ng/g) en glándula digestiva de mejillón (*M. galloprovincialis*) por profundidades: 1m, 5m y 10m. C: Muestras control. LD: Límite de detección. Entre paréntesis el número de días desde que se cerró el polígono por presencia de toxina.

Muestra	Control	Muestra	Grove 14/07/2010 (0 días)	Bueu-1 30/06/2010 (2 días)	Bueu-2 08/07/2010 (10 días)	Bueu-3 14/07/2010 (16 días)	Bueu-4 15/09/2010 (79 días)
C1	<LD	M1_1m	1.589	425,6	6.757,40	8.806,10	1.379,60
C2	<LD	M2_1m	873,8	533,5	8.416,50	7.434,70	1.696,60
C3	5,63	M3_1m	1.245,40	749,9	6.975,60	11.798,90	2.295,40
C4	<LD	M4_1m	1.150,20	658,2	8.760,30	5.135,50	2.72,7
C5	1,63	M5_1m	486,7	582,2	5.252,20	11.169,20	956,2
C6	1,05	Media 1m	1.069	589,9	7.232,40	8.868,90	1.320,1
C7	1,11	M1_5m	1.115	1.289,30	4.096,80	19.951,30	1.160,80
C8	<LD	M2_5m	814,2	1.596,30	4.715,30	31.274,60	1.774
C9	<LD	M3_5m	859,6	2.144,80	6.690,20	27.852,20	1.157,40
C10	1,1	M4_5m	272,8	1.496,70	2.852	25.203,10	2.072,70
C11	1,22	M5_5m	1.367	1.978	4.423,50	48.414,60	3.694,10
C13	0,64	Media 5m	885,7	1.701	4.555,60	30.539,20	1.971,80
C14	3,84	M1_10m	1.620,90	2.002,70	1.552,10	50.252	1.338,80
C15	0,47	M2_10m	669,4	1.887,10	1.988,60	53.194	1.977,70
C16	<LD	M3_10m	782,6	2.242,40	2.190,10	80.052,70	1.269,40
C17	<LD	M4_10m	953,7	975,7	3.594,40	57.486,10	880,6
C18	<LD	M5_10m	759,4	5.414,10	1.068,10	77.892,20	1.473,20
C19	0,84	Media 10m	957,2	2.504,40	2.078,60	63.775,40	1.387,90
Media	1,77	Media total	970,6	1.598,40	4.622,20	34.394,50	1.559,90

En la Figura 44, de la página siguiente, puede verse un diagrama de cajas y bigotes, que refleja la distribución de los valores obtenidos en los distintos muestreos. El principal compuesto tóxico presente fue el ácido okadaico (OA).

4. Resultados

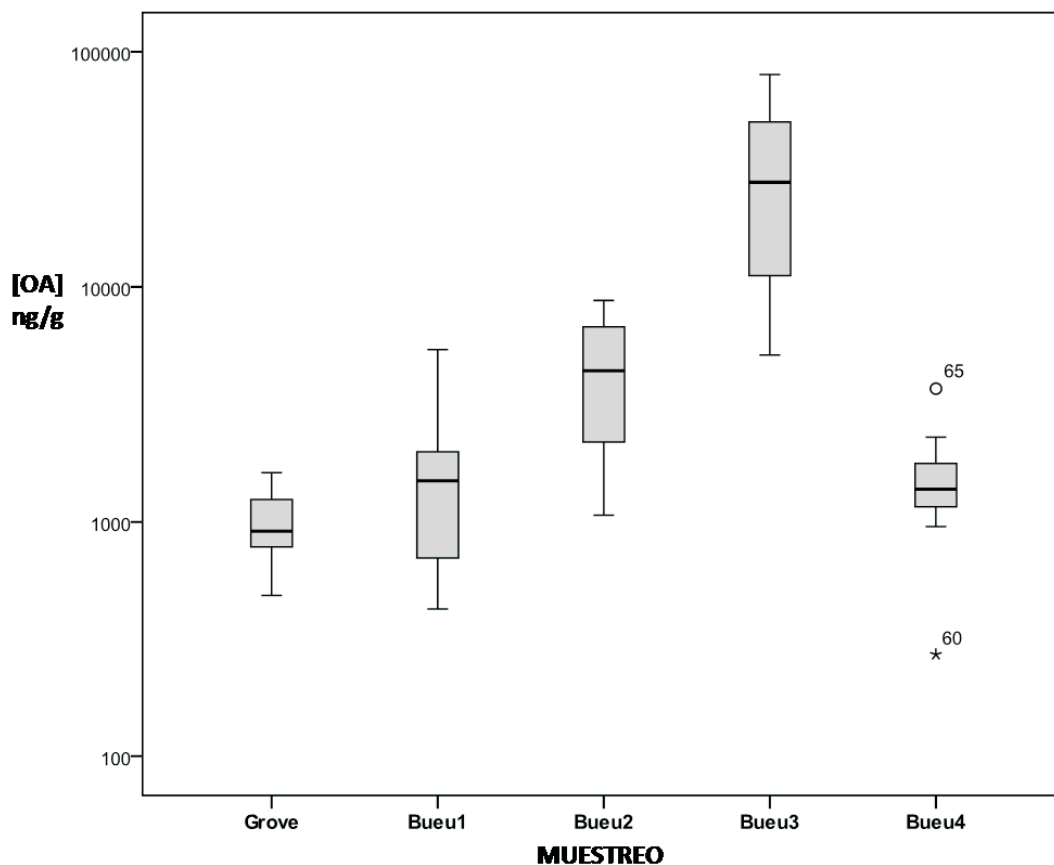


Figura 44. Diferencias en la concentración de ácido okadaico (ng/g). Medición realizada en glándula digestiva para las muestras recogidas durante la presencia del episodio tóxico, causado por *Dinophysis acuminata*. Los extremos de la caja representan los percentiles 25/75, la línea central marca el valor de la mediana y los bigotes superior e inferior indican el rango de valores (máximo y mínimo). Los círculos representan los valores *outlier*, es decir, que caen fuera del intervalo esperado (valores con un rango intercuartil entre 1,5 y 3). Las estrellas representan los valores extremos (valores con un rango intercuartil mayor a 3). Grove: 0 días, Bueu 1: 2 días, Bueu 2: 10 días, Bueu 3: 16 días, Bueu 4: 72 días.

4.4. Expresión de los genes *mdr*

Una vez confirmada la presencia de los dos genes *mdr* en el mejillón y analizadas las secuencias, se llevó a cabo un estudio de la expresión de ambos genes. Se comparó su presencia entre tres tejidos importantes del mejillón (glándula digestiva, branquia y manto) y también se analizó la expresión a lo largo de una proliferación fitoplanctónica tóxica con presencia de toxina DSP.

4. Resultados

4.4.1. Selección y análisis de los genes de referencia

Para el análisis de la expresión, se hubo de realizar una normalización de los resultados, empleando un grupo de genes de referencia que se mantuviesen estables en las distintas situaciones del experimento. Los genes que se decidieron incluir en el análisis fueron: NADH deshidrogenasa subunidad 4 (*nd4*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*), citocromo c oxidasa subunidad I (*cox1*), proteína de fusión ubiquitina - proteína ribosomal S27 (*rps27*), factor de iniciación de la traducción 5A (*tif5a*), 40S proteína ribosomal S4 (*rps4*), actina (*act*) y 18S RNA ribosomal (*18S*). Sobre ellos, se realizó una comparación de la estabilidad, usando tres programas informáticos (tal como se explicó anteriormente en el apartado 3.4.3. *Genes de referencia, diseño de los cebadores y eficiencia de la PCR*).

Primero, se diseñaron unos cebadores. Para ello se usaron como plantilla las secuencias obtenidas de la base de datos GenBank y algunos resultados derivados del análisis de nuestras propias secuencias. Los oligonucleótidos fueron diseñados usando el programa 3.1 *OligoAnalyzer* (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) y se encargó su síntesis a Thermo (Alemania). Se prestó especial atención a la longitud de los cebadores, la temperatura de anillado, la composición de nucleótidos y la estabilidad del extremo 3'. Con el fin de asegurar la eficiencia óptima de la reacción, la longitud de los amplicones osciló entre 84 y 171 pb (Tabla 5).

Una vez diseñada cada pareja de cebadores, fueron probados para confirmar que los fragmentos amplificados eran los esperados y no se generaban productos inespecíficos. Se analizaron con una electroforesis en gel de agarosa al 2%, para confirmar el tamaño y luego fueron enviados a secuenciar para comprobar si correspondían a los genes previstos. La especificidad de los productos amplificados se confirmó por la presencia de una sola banda, del tamaño esperado para cada gen. Estas fueron purificadas para enviar a secuenciar. Los amplicones obtenidos se compararon en la base de datos, confirmando así las identidades de cada gen y ratificando la presencia de un solo producto tras la reacción. Los análisis de la curva de fusión, generados por el iCycler, han de presentar un solo pico. Así también se pudo verificar la presencia de un único producto.

4. Resultados

La eficiencia (E) de la RT-qPCR y los coeficientes de correlación (r) fueron determinados mediante los valores obtenidos de las pendientes de las rectas, generadas usando diluciones seriadas 1:5 para cada gen. El Cq es el número de ciclos necesarios para que la fluorescencia llegue a un nivel de umbral específico de detección y está inversamente relacionado con la cantidad inicial de cDNA que se encuentra en la reacción (Gibson *et al.*, 1996). Para el *18S* se empezó con una dilución inicial de 1:3125 respecto a los otros genes. Se incluyeron controles para comprobar la ausencia de contaminaciones en la reacción, sustituyendo en un par de pocillos la muestra de cDNA por RNA (*no RT control*). En otros dos pocillos se añadió agua en vez de la muestra (*NTC control*).

Los resultados de eficiencia oscilaron entre 111,3% (para *act* en las branquias) y el 85,9% (*cox1* en la glándula digestiva), mientras que los coeficientes de correlación variaron desde 0,988, para el gen *tif5a* en la glándula digestiva, hasta 0,999 del *18S* en las branquias (Tabla 9). Los valores que se obtuvieron fueron utilizados para llevar a cabo los análisis de expresión, a lo largo del episodio tóxico.

Tabla 9: Nombres de los genes de referencia y valores de eficiencia y sus coeficientes de correlación, obtenidos de las pendientes de las rectas, hechas para cada gen.

Nombre del gen	Símbolo	Eficiencia (%)			Coeficiente de correlación		
		Glándula digestiva	Branquias	Manto	Glándula digestiva	Branquias	Manto
NADH deshidrogenasa subunidad 4	<i>nd4</i>	105,8	100,5	100,9	0,996	0,997	0,997
gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	<i>gapdh</i>	99,3	107,3	96,5	0,992	0,992	0,993
citocromo c oxidasa subunidad I	<i>cox1</i>	85,9	97,6	91,6	0,996	0,994	0,996
ubiquitina proteína de fusión - proteína ribosomal S27	<i>rps27</i>	92	101,2	97,3	0,996	0,994	0,99
factor de iniciación de la traducción 5A	<i>tif5a</i>	96,9	99,3	104,6	0,988	0,994	0,991
40S proteína ribosomal S4	<i>rps4</i>	91,1	93,5	95,8	0,994	0,996	0,998

continúa...

4. Resultados

Tabla 9 (continuación)

Nombre del gen	Símbolo	Eficiencia (%)			Coeficiente de correlación		
		Glándula digestiva	Branquias	Manto	Glándula digestiva	Branquias	Manto
actina	<i>act</i>	91	111,3	100,3	0,993	0,991	0,996
18S RNA ribosomal	<i>18S</i>	99,2	87,7	94	0,99	0,999	0,996

Por otra parte, para realizar el análisis de expresión entre los tres tejidos, los datos que se utilizaron se obtuvieron de los resultados producidos tras las reacciones de PCR. Los valores de las diluciones seriadas obtenidos con el iCycler fueron empleados para calcular la eficiencia de cada pareja de cebadores, mientras que, en la determinación de los valores de Cq, se hizo el cálculo con el algoritmo Miner (<http://www.miner.ewindup.info>; Zhao & Fernald, 2005), partiendo de los valores brutos de fluorescencia generados por el equipo.

Este algoritmo representa cada curva exponencial de PCR, haciendo posible tener valores exactos para la cuantificación de la RT-qPCR. La muestra branquia 15 es eliminada de los análisis posteriores, ya que los valores de Cq obtenidos se ve que son mayores de lo esperado, probablemente por una incorrecta reacción de amplificación (Tabla 10). El Cq corresponde al valor máximo de la segunda derivada e indica el punto final de la fase de amplificación exponencial.

La eficiencia de los tres tejidos, en conjunto, se determinó como una media de las eficiencias de todas las muestras y fueron calculadas para cada uno de los genes. A continuación, se utilizaron para transformar los valores de Cq en los valores de expresión, que sirvieron para analizar los datos, posteriormente, con los programas elegidos.

Tabla 10: Valores de Cq y eficiencias obtenidas tras la transformación de los valores en bruto, con el algoritmo Miner. La muestra Brq 15, está encuadrada, debido a que presentó unos valores mayores a lo esperada, por lo que fue eliminada del análisis. GD: glándula digestiva, BRQ: branquia, MNT: manto.

Muestra	nadh	gapdh	cox1	rps27	tif5a	rps4	act	18S
GD_C 1	22	23,2	18,4	21,9	23,9	20,9	26,2	20

continúa...

4. Resultados

Tabla 10 (continuación)

	Muestra	nadh	gapdh	cox1	rps27	tif5a	rps4	act	18S
Caramiñal. sin toxina	GD_C 2	21,7	23,5	19,8	19,8	24,1	21	25,8	19,5
	GD_C 3	27,1	24,1	19,2	23,4	23,7	22,5	27,8	20,9
	GD_C 4	25,9	25,4	20,2	23,3	24,9	23,2	29,8	24,3
	GD_C 5	28,1	23,3	19,5	22,4	24,7	21,3	26,4	19,7
	GD_C 6	26,6	22,7	19,5	22,9	23,5	21,2	26,8	23,5
	GD_C 7	22,2	24,3	19,1	22	25,3	23,1	28,4	19,5
	GD_C 8	25,4	22,8	18,6	21,4	23,6	21,4	26,7	20,6
	GD_C 9	25,4	24,3	19,4	21,5	25,7	22	26	21
	GD_C 10	26,9	24,1	17,7	22,7	26,2	23	27,7	20,8
	GD_C 11	27,2	26,6	18,1	25,2	27,9	25,6	28,8	23,6
	GD_C 13	22	25,8	19,3	27,3	27,7	25	28,1	19,7
	GD_C 14	25,3	24,3	18,3	23,4	28,8	22,5	27	23,2
	GD_C 15	27,8	22,9	18,8	24,7	24,8	21,8	26,2	19,8
	GD_C 16	21,9	24,6	19,4	25,5	26,6	24,2	27	19,8
	GD_C 17	26,5	22,7	18,6	23,1	24	21,5	27,3	20,2
	GD_C 18	19,2	22,4	16,5	22,4	22,7	20,5	26,5	19,2
	GD_C 19	28	26,1	20,3	26,5	29,1	25,9	29,9	20,3
	BRQ_C 1	21,7	22,8	17,8	21,9	25,8	21,1	25,2	19,6
	BRQ_C 2	21,5	22,3	18,6	20,8	24,3	20,7	25,6	20,9
	BRQ_C 3	22,3	23,6	18,5	21,9	23,6	22	27,6	20,5
	BRQ_C 4	22,4	23,8	18,3	21,4	25,6	22,4	27,2	21
	BRQ_C 5	22,7	22,3	18,3	21,5	26,1	21,3	27	20,3
BRQ_C 6	24,8	22	18,4	22	26,1	23,1	26,8	20,5	
BRQ_C 7	22	22,2	18,9	20,4	23,7	21,6	28,1	21	
BRQ_C 8	22,3	23,5	18	21,6	25	22,2	27,1	20	
BRQ_C 9	23,5	22,3	18,3	20,7	25,6	21,5	25,8	20,5	
BRQ_C 10	22	23,4	18,1	21,4	26,6	22,3	25,7	20,9	
BRQ_C 11	21,5	23,1	17,3	21,2	24,8	22	26,4	20,5	

continúa...

4. Resultados

Tabla 10 (continuación)

	Muestra	nadh	gapdh	cox1	rps27	tif5a	rps4	act	18S	
Caramiñal. sin toxina	BRQ_C 13	20,5	21,6	18,2	21,3	22,9	20,9	24,8	20,6	
	BRQ_C 14	22,2	24,1	18,2	23,1	28,7	22,1	28,2	22,4	
	BRQ_C 15	28,1	28,7	26,1	31,8	32	27	32,3	21,9	
	BRQ_C 16	20,8	21,3	18,3	21,7	24,8	21,6	25,6	20,6	
	BRQ_C 17	23,3	23	19	23,1	25,6	22,9	28	23,1	
	BRQ_C 18	20,3	23,6	18	22,1	24,8	22,1	28,6	21,3	
	BRQ_C 19	23,2	21,7	17,7	21,6	24,5	21	25,3	19,9	
	MNT_C 1	22,3	24,3	18,7	22,2	24,3	21,6	24,9	22,6	
	MNT_C 2	20,3	23,1	18,5	19,8	23,2	21,2	23,3	22,8	
	MNT_C 3	27,2	23	19,4	20,9	20,9	20,2	22,9	23,3	
	MNT_C 4	28,7	25,7	23,7	23,4	25,7	23,5	25,8	26,1	
	MNT_C 5	27,5	23,4	19,7	21,7	24,2	21,5	22,4	22,8	
	MNT_C 6	27,5	23,3	20,4	21,4	22,4	20,6	23,3	22,8	
	MNT_C 7	23,3	23,9	20,1	20,9	22,6	21,4	22,8	24	
	MNT_C 8	26,1	25,2	19,6	22,8	24	22,5	24,8	23	
	MNT_C 9	27,3	22,6	19,8	20,4	23,6	20,2	23,2	22,4	
	MNT_C 10	26,3	21,3	18,8	20,3	22,8	20,2	23	22,7	
	MNT_C 11	24,9	21,5	17	19,7	21,9	20,1	21,3	21,3	
	MNT_C 13	20,3	24,2	18,1	23	23,7	21,7	24,9	22,5	
	MNT_C 14	27,5	26,8	21,2	26,4	31,1	23,2	25,2	23,9	
	MNT_C 15	26,6	21,7	19,1	20,7	23	21,1	22,3	24,7	
	MNT_C 16	21,5	25,4	18,6	24,8	25,4	24,4	26,3	22	
	MNT_C 17	27,2	24,2	20,3	23,7	25,1	22,6	26,7	25,6	
	MNT_C 18	21,5	25,4	18,3	22,4	24,2	21,9	25,8	24	
	MNT_C 19	26,9	23,3	19,7	23,7	26,4	22,2	24,3	23,8	
		Eficiencia Media	0,92	0,95	0,9	0,95	0,97	0,98	0,95	0,95

4. Resultados

El diagrama de cajas (Figura 45) muestra el rango y la distribución de los valores Cq, permitiendo observar la amplia variabilidad de la expresión de los genes entre los tejidos. En los genes de referencia, la *act* mostró los niveles de expresión más bajos (29,9), mientras que *cox1* mostró el más alto (16,5) para las muestras seleccionadas. Se debe tener en cuenta que las muestras *18S* se diluyeron 1:10000, debido a que es muy abundante. Esta dilución corresponde a 13,29 Cq de diferencia con los valores obtenidos (Tabla 10).

Por otra parte, se realizó un análisis para comparar unas muestras control frente a otras con toxina DSP, debido a la presencia de una floración de fitoplancton tóxico. La RT-qPCR se llevó a cabo en 93 muestras y se analizaron para los tres tejidos. Los 8 genes utilizados para la normalización también mostraron un rango relativamente amplio del nivel de expresión, desde la media más baja para los valores de Cq, con 16,14 para *cox1* en el manto, hasta el más alto, con un valor medio de 26,54 para la *act*, en la glándula digestiva (Tabla 11). Los valores de Cq de los genes de referencia se pueden consultar en el Anexo 8.4.

Tabla 11: Valores medios de Cq de las muestras control y las muestras con toxina, para cada uno de los tejidos.

			<i>gapdh</i>	<i>rps4</i>	<i>cox1</i>	<i>tif5a</i>	<i>rps27</i>	<i>act</i>	<i>18S</i>	<i>nd4</i>
Glándula digestiva	CONTROL	Media	22,68	21,29	17,47	24,07	22,02	25,88	19,47	23,55
		Desv. típ.	1,33	1,59	0,97	1,95	1,81	1,22	1,49	2,65
	TOXINA	Media	22,69	21,18	17,35	24,29	21,63	26,54	19,55	22,94
		Desv. típ.	0,86	0,99	1,06	1,40	1,31	1,42	1,57	2,40
Branquias	CONTROL	Media	21,25	20,34	16,48	23,77	20,38	25,17	19,34	21,17
		Desv. típ.	0,88	0,68	0,47	1,22	0,59	1,11	0,85	1,20
	TOXINA	Media	20,89	19,6	16,14	23,16	19,97	24,51	19,05	20,46
		Desv. típ.	0,88	0,70	0,6	1,41	1,00	0,99	1,00	1,06
Manto	CONTROL	Media	21,57	20,67	16,91	24,12	20,88	25,39	19,30	21,38
		Desv. típ.	1,60	1,32	1,88	1,96	2,37	1,70	0,79	1,73
	TOXINA	Media	20,91	19,61	16,15	23,18	20,00	24,54	19,05	20,50
		Desv. típ.	0,87	0,69	0,60	1,41	1,00	1,03	1,00	1,10

4. Resultados

El diagrama de cajas (Figura 45) muestra el alcance y la distribución de los valores Cq, lo que permite ver la variabilidad de los genes entre las distintas situaciones, observándose una amplia variación. Estas gráficas proporcionan

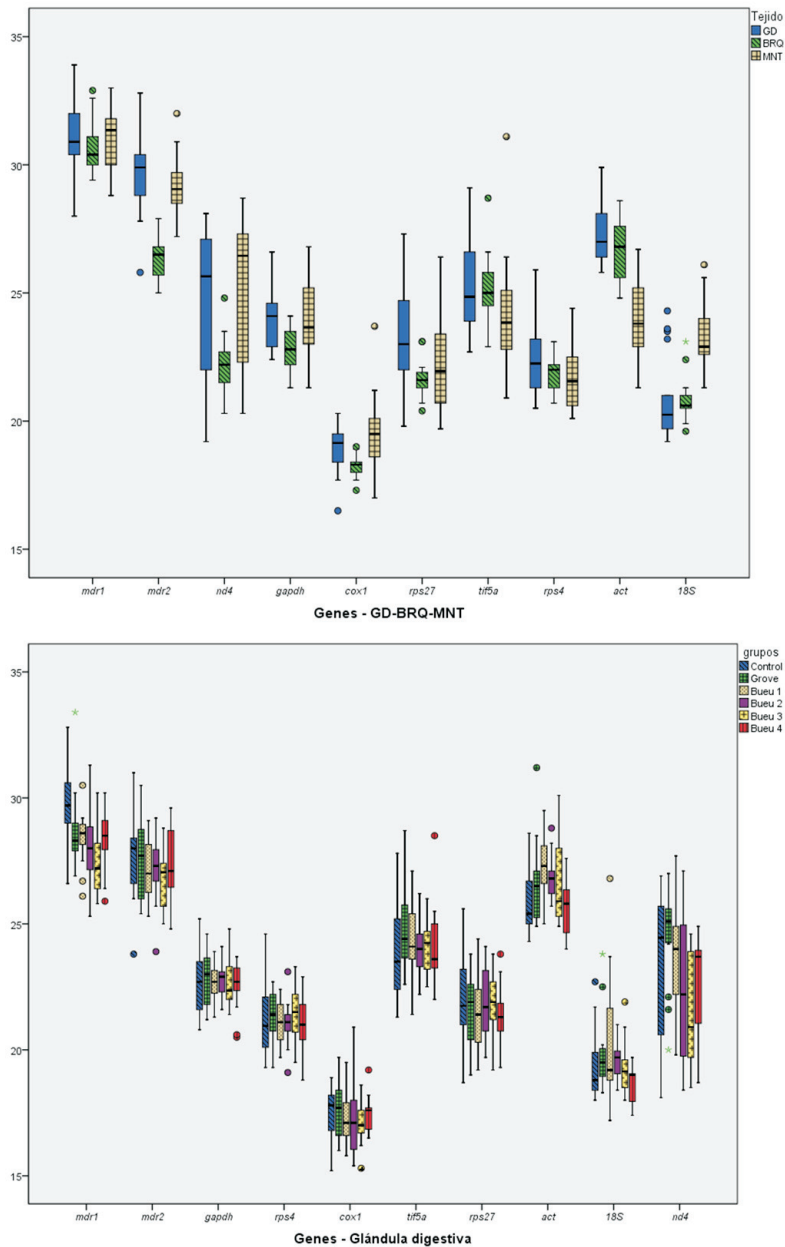


Figura 45. Niveles de expresión (Cq) de los 8 genes de referencia candidatos y los dos genes de estudio entre los tres tejidos, y en cada uno de ellos comparando los distintos muestreos. Los valores de Cq están representados para cada gen y cada situación con diagramas de caja. El cuadro central representa los percentiles 25/75; la línea interior de la caja marca el valor de la mediana y los bigotes, el rango de valores de Cq de todas las muestras en cada situación. Los círculos representan los valores *outlier*, es decir, que caen fuera del intervalo esperado (con un rango intercuartil ente 1,5 y 3). Las estrellas representan los valores extremos (rango intercuartil mayor a 3).

4. Resultados

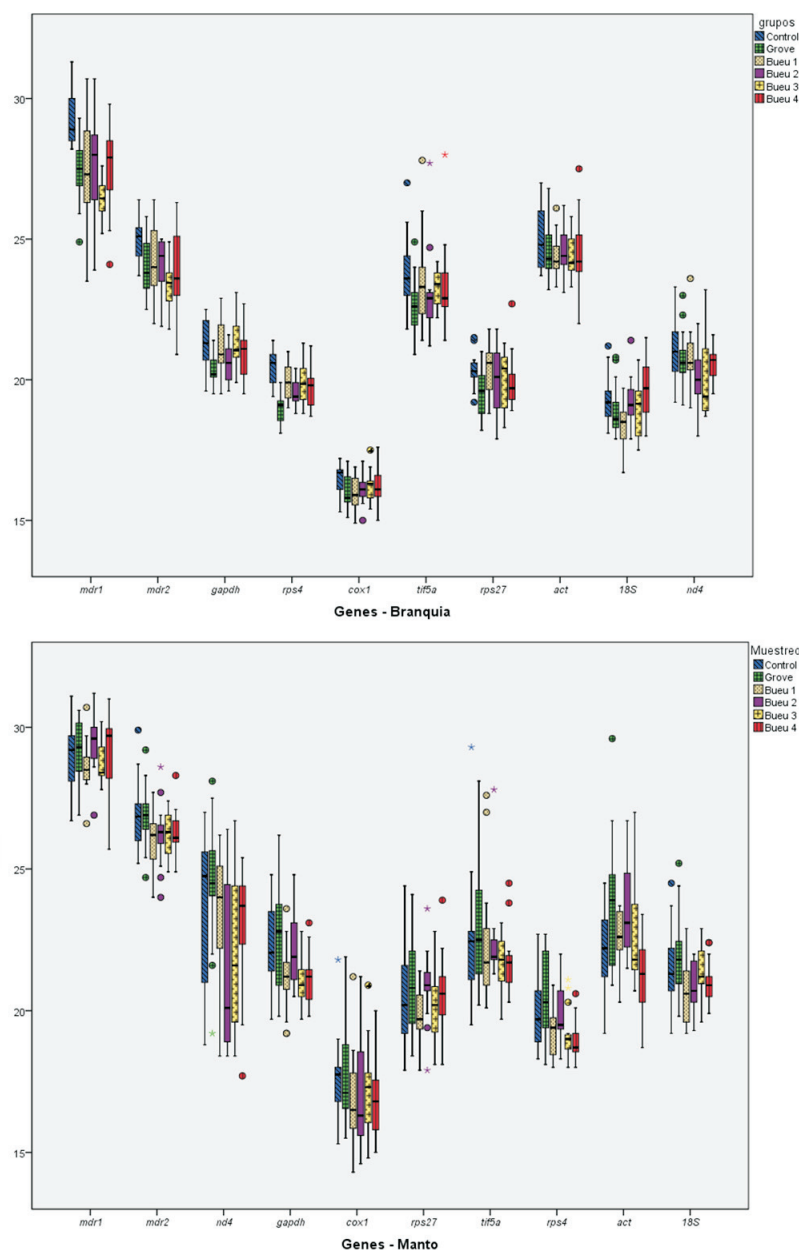


Figura 45 (continuación). Niveles de expresión (Cq) de los 8 genes de referencia candidatos y los dos genes de estudio entre los tres tejidos, y en cada uno de ellos comparando los distintos muestreos. Los valores de Cq están representados para cada gen y cada situación con diagramas de caja. El cuadro central representa los percentiles 25/75; la línea interior de la caja marca el valor de la mediana y los bigotes, el rango de valores de Cq de todas las muestras en cada situación. Los círculos representan los valores *outlier*, es decir, que caen fuera del intervalo esperado (con un rango intercuartil ente 1,5 y 3). Las estrellas representan los valores extremos (con un rango intercuartil mayor a 3).

una información adicional acerca de las distribuciones de los datos obtenidos. El área de la caja incluye el 50% de todas las observaciones; la línea media de la caja representa la mediana de la muestra y los bigotes representan el 50%

4. Resultados

de los valores extremos de las observaciones (el bigote de arriba corresponde al 25% superior de las observaciones, mientras que el de abajo, al 25% inferior).

4.4.2. Estabilidad de los genes de referencia

Para la selección de los genes de referencia, que se usarán para normalizar la expresión de los genes que se quieren analizar, se emplearon los tres programas informáticos previamente citados (apartado 3.4.3. *Genes de referencia, diseño de los cebadores y eficiencia de la PCR*).

Estos programas utilizan diferentes algoritmos para obtener unos valores, que sirven para ordenar los genes según su estabilidad a lo largo del experimento. Se ha de tener en cuenta que se deben de realizar distintos análisis, según la situación:

- por un lado, se analiza la estabilidad de los ocho genes de referencia, cuando se comparan los tres tejidos entre sí. Para esta comparación, se utilizaron las muestras control (sin toxina) recogidas en Caramiñal, cuyos valores están en la Tabla 10.
- por otra parte, se ha de estudiar cómo influye la presencia de toxina en la estabilidad de los posibles genes de referencia. Para ello, es preciso hacer los análisis para cada uno de los tejidos por separado, puesto que se pretende ver la actividad de las proteínas *mdr*, tanto en la glándula digestiva como en la bronquia y el manto.

4.4.2.1. geNorm

<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/geNorm/> (Vandesompele *et al.*, 2002)

Para llevar a cabo el cálculo de la estabilidad para cada gen, se emplea un algoritmo que se fundamenta en que la relación de expresión de dos genes internos debe ser similar en todas las muestras, independientemente de las condiciones experimentales. El programa analiza la variación en los ratios de expresión, reflejando si al menos uno, o bien los dos genes, no están siendo expresados de forma constante, por lo que su estabilidad es menor. Así, se va

4. Resultados

determinando la variación de cada gen, comparándolo a pares con los valores de los otros genes.

Esta comparación se calcula como la desviación estándar de la relación de expresión transformada logarítmicamente, seguido por el cálculo del valor de estabilidad del gen de referencia (valor M), que es como la media de la variación por pares de un gen de referencia particular con todos los demás posibles genes de referencia analizados (Vandensompele *et al.*, 2002).

Los genes son organizados de acuerdo con su estabilidad en la expresión o M (medida de la estabilidad del gen). Estos valores representan la variación media de cada gen de referencia frente a los otros genes de control utilizados en el experimento. La variación entre parejas de los genes de referencia se calcula como la desviación estándar de los valores de expresión transformados logarítmicamente, por lo que existe una relación inversa entre la estabilidad y el valor M. Así, los genes con valor M bajo tienen una baja variación y, por lo tanto, van a tener una expresión estable, mientras que los que tienen un alto valor de M serán menos estables.

Finalmente, se obtuvo una clasificación de los genes examinados, de acuerdo con su expresión de estabilidad, así como la determinación de la combinación de los genes más estables para la normalización. El gen con el mayor valor de M es excluido del análisis y el cálculo se repite de una forma gradual hasta que se encuentra la mejor combinación de genes.

En la Figura 46, de la página siguiente, se representa el valor medio de M de los genes restantes (después de excluir a cada gen con el mayor valor de M), siendo esto lo que se utiliza para la clasificación. La variación por parejas ($V_{n/n+1}$) se calcula basándose en los valores del factor de normalización, después de la adición gradual de al menos un gen de referencia estable (NF_N y NF_{N+1}). Se determina el número mínimo de genes de referencia necesarios para una adecuada normalización y se puede observar como, normalmente, el uso de genes adicionales contribuye a obtener una mejor normalización de los genes del estudio.

4. Resultados

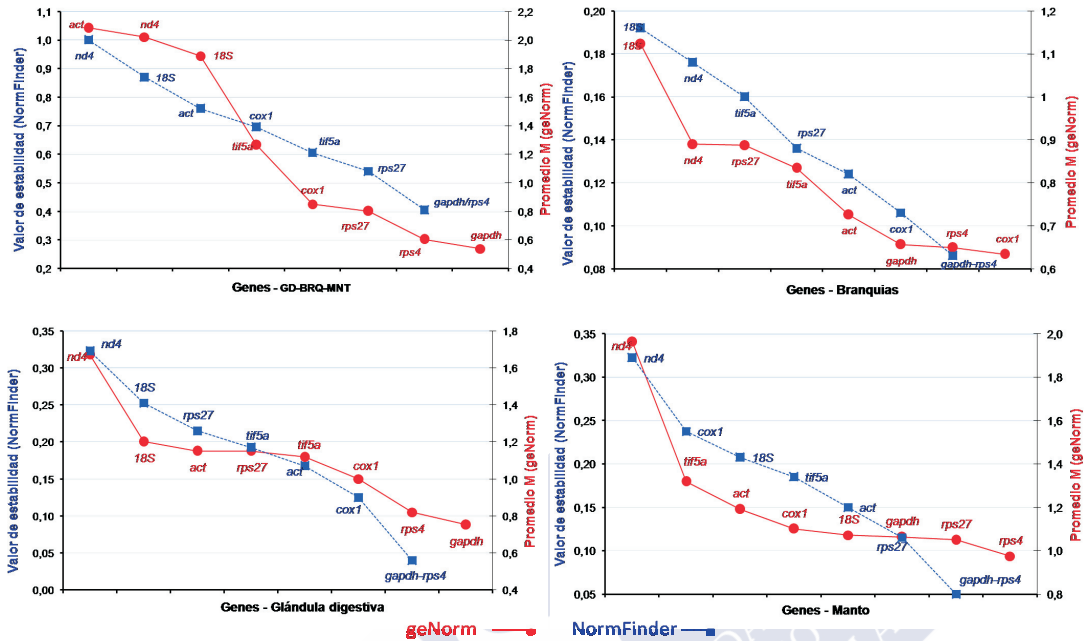


Figura 46. Estabilidad de los genes de referencia según los programas geNorm y NormFinder. Los genes más estables, se sitúan a la derecha de las gráficas.

El orden de estabilidad obtenido con este programa se puede consultar en la Figura 46 y en la Tabla 12, de la página siguiente. Destaca que, para todas las situaciones, la pareja de genes que presentó mayor estabilidad fue *gapdh* / *rps4*, mientras que los menos estables fueron *18S* y *nd4*, a excepción del manto, donde estos genes fueron *cox1* y *nd4*.

El geNorm sugiere que, para todas las situaciones, los dos genes con la expresión más estable serían *rps4* y *gapdh*. Además, los resultados obtenidos también proponen la adición complementaria de más genes de referencia. Esto favorece la consistencia del factor de normalización determinado de acuerdo con el grado de estabilidad generado por el programa.

4.4.2.2. NormFinder

<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm> (Andersen *et al.*, 2004)

4. Resultados

Tabla 12. Clasificación de los 8 genes de referencia, en orden de su estabilidad en la expresión, usando los tres programas: geNorm, NormFinder and Bestkeeper (SD: desviación estándar; r: coeficiente de correlación). Los genes elegidos para el estudio están resaltados.

GLÁNDULA DIGESTIVA				BRANQUIAS				MANTO				GD-BRQ-MNT					
ge-Norm	Norm-Finder	Bestkeeper		ge-Norm	Norm-Finder	Bestkeeper		ge-Norm	Norm-Finder	ge-Norm	Norm-Finder	Bestkeeper		ge-Norm	Norm-Finder	Bestkeeper	
		SD	r			SD	r					SD	r			SD	r
<i>gapdh</i> <i>-rps4</i>	<i>gapdh</i>	<i>gapdh</i>	<i>gapdh</i>	<i>gapdh</i> <i>-rps4</i>	<i>cox1</i>	<i>cox1-r</i> <i>ps4</i>	<i>rps4</i>	<i>gapdh</i> <i>-rps4</i>	<i>rps4</i>	<i>gapdh</i>	<i>18S</i>	<i>rps4</i>	<i>cox1</i>	<i>gapdh</i>	<i>gapdh</i>	<i>cox1</i>	<i>gapdh</i>
<i>cox1</i>	<i>rps4</i>	<i>cox1</i>	<i>rps4</i>	<i>cox1</i>	<i>rps4</i>	<i>rps27</i>	<i>rps4</i>	<i>rps27</i>	<i>rps27</i>	<i>rps4</i>	<i>rps4</i>	<i>tif5a</i>	<i>rps4</i>	<i>rps27</i>	<i>rps4</i>	<i>rps4</i>	<i>rps27</i>
<i>act</i>	<i>cox1</i>	<i>act</i>	<i>tif5a</i>	<i>act</i>	<i>gapdh</i> <i>-18S</i>	<i>gapdh</i>	<i>gapdh</i>	<i>act</i>	<i>gapdh</i>	<i>act</i>	<i>gapdh</i>	<i>rps27</i>	<i>gapdh</i>	<i>rps27</i>	<i>rps4</i>	<i>gapdh</i>	<i>rps4</i>
<i>tif5a</i>	<i>rps27</i>	<i>rps27</i>	<i>act</i>	<i>rps27</i>	<i>rps27</i>	<i>act</i>	<i>act</i>	<i>tif5a</i>	<i>18S</i>	<i>tif5a</i>	<i>rps27</i>	<i>gapdh</i>	<i>act</i>	<i>cox1</i>	<i>tif5a</i>	<i>rps27</i>	<i>tif5a</i>
<i>rps27</i>	<i>act</i>	<i>act</i>	<i>rps27</i>	<i>tif5a</i>	<i>act</i>	<i>tif5</i>	<i>act</i>	<i>18S</i>	<i>cox1</i>	<i>18S</i>	<i>tif5a</i>	<i>act-18S</i>	<i>act</i>	<i>tif5a</i>	<i>cox1</i>	<i>tif5a</i>	<i>cox1</i>
<i>18S</i>	<i>act</i>	<i>nd4</i>	<i>nd4</i>	<i>nd4</i>	<i>nd4</i>	<i>nd4</i>	<i>nd4</i>	<i>cox1</i>	<i>act</i>	<i>18S</i>	<i>cox1</i>	<i>cox1</i>	<i>18S</i>	<i>18S</i>	<i>act-18S</i>	<i>act-18S</i>	<i>act</i>
<i>nd4</i>	<i>18S</i>	<i>cox1</i>	<i>cox1</i>	<i>18S</i>	<i>tif5a</i>	<i>18S</i>	<i>tif5a</i>	<i>nd4</i>	<i>tif5a</i>	<i>nd4</i>	<i>tif5a</i>	<i>nd4</i>	<i>nd4</i>	<i>nd4</i>	<i>nd4</i>	<i>nd4</i>	<i>nd4</i>
	<i>nd4</i>	<i>nd4</i>	<i>18S</i>		<i>18S</i>									<i>act</i>			<i>18S</i>

4. Resultados

NormFinder es otro programa que ordena los genes candidatos de acuerdo con el valor de estabilidad de la expresión del mRNA, para una muestra conocida y un diseño experimental. Permite la estimación de la variación total de los genes candidatos de referencia y además calcula la variación entre los distintos subgrupos del conjunto de muestras. La estabilidad de expresión de los genes de referencia se calcula de acuerdo a su mínima variación de expresión, combinando la variación inter e intra-grupo. Se obtienen unos valores de estabilidad, donde la expresión de los genes más estables es indicada por los valores más bajos. El valor de estabilidad representa una medida práctica del error sistemático, que será introducido en los resultados finales cuando se utiliza este gen particular como gen de referencia.

La clasificación que se obtuvo utilizando este programa parece ser similar a la anteriormente determinada usando geNorm. Es posible hallar ciertas diferencias en las posiciones, pero se puede observar que los genes más estables son, generalmente, los mismos en ambos programas. *gapdh* y *rps4* presentan, en general, bastante estabilidad en todas las situaciones.

También se comprueba como la estabilidad de los genes varía según el tejido analizado, siendo *cox1* el más estable para realizar los análisis en branquia. Además, *nd4* y *18S* son determinados como los genes menos estables. Esto se puede observar en el gráfico donde se comparan los resultados del geNorm, frente a los de NormFinder (Figura 46), que indica la clasificación según la estabilidad de la expresión de los genes de referencia, determinado con los programas geNorm y NormFinder. Los genes menos estables están a la izquierda y los más estables a la derecha.

También se puede consultar el orden de estabilidad de los genes, que se obtuvo con los distintos programas, en la Tabla 12.

4.4.2.3. BestKeeper

<http://www.genequantification.de/bestkeeper.html> (Pfaffl *et al.*, 2004)

4. Resultados

El principio para la identificación de los genes de referencia adecuados (con una expresión estable) es que sus niveles de expresión deben estar altamente correlacionados. Para los genes considerados como estables, el programa calcula el Índice BestKeeper (la media geométrica de los valores de Cq de los genes de referencia candidatos). Luego se calcula la correlación entre los Cq de cada gen de referencia candidato y el índice BestKeeper. El programa BestKeeper clasifica a los genes (de mejor a peor), basándose en un alto coeficiente de correlación r de los valores de Cq con el índice BestKeeper. Para considerar los genes analizados como apropiados para la normalización, Pfaffl *et al.* (2004) recomendó un valor de SD inferior a 1. Si fuese superior, se puede considerar como inconsistente y, por tanto, excluido del cálculo.

Según los datos de los que se partan, los resultados obtenidos pueden variar mucho y presentar valores diferentes; por lo tanto, es conveniente que sea el propio investigador el que determine los límites. Los valores generados por el programa se muestran en la Tabla 13 y la clasificación de los genes de referencia en la Tabla 12. Los resultados varían, dependiendo de si para el análisis se utiliza la desviación estándar (SD) o el coeficiente de correlación (r). Los genes más estables, seleccionados por los otros programas, también suelen presentar una buena calificación según los resultados generados por BestKeeper.

Tabla 13. Resultados obtenidos del BestKeeper para realizar la clasificación de estabilidad de los genes de referencia. Los valores mayores de desviación estándar (SD) indican genes inestables, por lo que deberían ser eliminados del análisis (Pfaffl *et al.*, 2004).

		<i>rps4</i>	<i>tif5a</i>	<i>gapdh</i>	<i>rps27</i>	<i>18S</i>	<i>cox1</i>	<i>act</i>	<i>nd4</i>
GD-BRQ-MNT	SD[± Cq]	0,97	1,48	1,08	1,34	1,53	0,82	1,53	2,5
	coef. corr. [r]	0,79	0,71	0,8	0,81	0,41	0,64	0,47	0,59
GLÁNDULA DIGESTIVA	SD[± Cq]	0,87	1,19	0,76	1,1	1,06	0,81	1,11	2,15
	coef. corr. [r]	0,76	0,71	0,776	0,573	0,4	0,49	0,66	0,56
BRANQUIAS	SD[± Cq]	0,67	1,08	0,78	0,87	0,78	0,56	0,9	0,92
	coef. corr. [r]	0,87	0,77	0,84	0,857	0,33	0,87	0,81	0,65
MANTO	SD[± Cq]	0,97	1,25	1,15	1,18	0,89	1,32	1,42	2,37
	coef. corr. [r]	0,76	0,74	0,688	0,704	0,68	0,65	0,68	0,49

4. Resultados

Según este programa, el orden en que clasifica los genes varía bastante, según se analice el coeficiente de correlación (r) o la desviación estándar (SD). Primero, se debería comprobar el valor de SD , puesto que analiza como varían las medias geométricas de todos los C_q , por lo que cuanto más elevado sea el valor, indicará una mayor dispersión de los datos y, por tanto, poca estabilidad. Los genes con valores altos de SD deberían ser eliminados.

Por otra parte, el valor r representa los coeficientes de correlación, calculados de forma emparejada entre cada gen y un índice BestKeeper (media geométrica de los valores del ciclo umbral (C_q) para genes de referencia agrupados), y debería tomar valores cercanos a 1 para presentar una correlación fuerte y directa, que indicaría una buena estabilidad del gen.

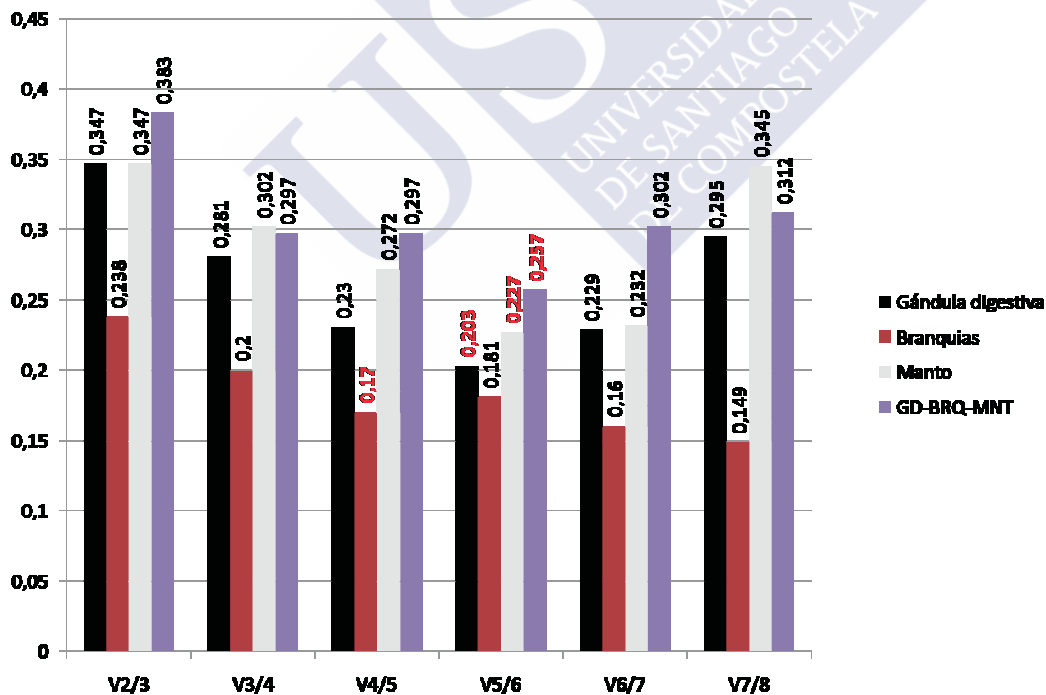


Figura 47. Análisis del número óptimo de genes de control para la normalización, basándose en la variación por pares (V_n / V_{n+1}) entre los genes candidatos. A medida que se emplean más genes para la normalización, se observa como favorece el factor de normalización, hasta que la adición de nuevos genes provoca un aumento de la inestabilidad. En rojo, el valor más bajo, que indica el número óptimo de genes para realizar la normalización de los genes, en cada tejido.

4. Resultados

En resumen, basándose en los resultados obtenidos por los tres métodos de análisis diferentes (Tabla 12) de los ocho genes de referencia analizados para estas condiciones experimentales, aquellos que codifican para la *gapdh* y para el *rps4* son considerados como los más estables. Además, la cantidad de genes necesarios para una normalización más consistente fue calculada usando el parámetro $V_{n/n+1}$, obtenido con el programa geNorm (Figura 47). El uso de un tercer y cuarto gen, en branquia (incluso un quinto, para los demás análisis), tendrá un efecto significativo, por lo que sería interesante que fueran incluidos en el cálculo final.

Basándonos en los resultados obtenidos con los tres programas, los genes elegidos para la normalización de los datos (en *Apartado 5.2. Análisis de genes de referencia*, se justifica el número de genes utilizado en la normalización) serían:

- Los tres tejidos (glándula digestiva, branquias y manto): *gapdh*, *rps27*, *rps4* y *cox1*.
- Glándula digestiva: *gapdh*, *rps4* y *cox1*.
- Branquia: *gapdh*, *rps4* y *cox1*.
- Manto: *gapdh*, *rps4* y *rps27*.

4.4.3. Comparación de la expresión entre tejidos de los genes *abcb* (*mdr*)

La expresión relativa de *mdr1* y *mdr2* en los tejidos de *M. galloprovincialis* fue examinada utilizando los cuatro genes de referencia más estables, *gapdh*, *rps4*, *rps27* y *cox1*, para la normalización.

Tabla 14: Valores de Cq obtenidas en *mdr1* y *mdr2*, tras la transformación de los valores en bruto con el algoritmo Miner. La muestra branquia 15 está resaltada, debido a que presentó unos valores mayores de lo esperado, por lo que fue eliminada del análisis. Las eficiencias medias entre los tres tejidos serían, para *mdr1*, 0,99 y, para *mdr2*, 0,97.

MUESTRA	Glándula digestiva		Branquia		Manto	
	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>
C 1	28	28,9	29,8	26,3	31,4	27,6
C 2	30,4	29,9	30,9	26,8	32,8	28,9
C 3	30,6	30,7	30,4	26,9	28,8	27,3

continúa...

4. Resultados

Tabla 14 (continuación)

MUESTRA	Glándula digestiva		Branquia		Manto	
	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>
C 4	32,2	30	31,4	27,9	29,8	32
C 5	31,1	30,2	31,1	25,5	31,5	30,2
C 6	31	28,9	32,9	25,7	29,6	28,6
C 7	31,4	30,4	30,1	26,5	33	29,2
C 8	33,1	28	29,4	25	31,4	28
C 9	30,7	28,8	31,1	26,4	30,1	27,2
C 10	29,7	27,8	32,6	26,3	30,2	28,9
C 11	33,9	31,5	30,3	26,6	29,5	28,6
C 13	32,3	30,7	30	25,7	31,2	29,7
C 14	32	30,3	31,7	27,8	31,9	30,9
C 15	30,8	28,7	34	30,7	31,4	29,2
C 16	30,6	29,9	29,8	26,5	30	30,6
C 17	29,7	29	30,3	27,2	31,8	28,5
C 18	29,7	25,8	30,4	26,5	31,3	29,5
C 19	31,1	32,8	30	25,3	32,3	29,2
	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>				
	0,99	0,97	←Eficiencia			

Con el fin de verificar como varía la expresión entre los tejidos analizados (glándula digestiva, branquias y manto), se realizó un análisis estadístico preciso, usando el programa IBM SPSS 19. Los datos de Cq obtenidos con el algoritmo Miner y la eficiencia calculadas con rectas de dilución en el iCycler (Tablas 10 y 14) se utilizan para calcular la expresión relativa normalizada (como se explica en el apartado 3.4.5. *Análisis de los datos*). Dicha expresión normalizada se transforma logarítmicamente en base 2, antes de realizar los análisis estadísticos.

Se comienza realizando unas pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas, mediante el test de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene, respectivamente. A continuación, se realiza un análisis entre los grupos mediante análi-

4. Resultados

sis de la varianza (ANOVA) de una vía. En los casos donde se observan diferencias significativas, se utilizaron comparaciones múltiples *a posteriori*. En este caso, la prueba HSD de Tukey, asumiendo varianzas iguales, usada para realizar comparaciones múltiples por pares. Una probabilidad (P) de valor <0,05 fue considerada significativa. Véase la Tabla 15.

Tabla 15: Resultados de las pruebas estadísticas realizadas con el programa IBM SPSS 19 (gl: grados de libertad; Sig.: nivel de significación- $p < 0,05$; F: variación entre grupos, GD: glándula digestiva, BRQ: branquia, MNT: manto).

Pruebas de normalidad				
	Tejido	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.
<i>mdr1</i>	GD	,957	18	,549
	BRQ	,932	17	,239
	MNT	,951	18	,433
<i>mdr2</i>	GD	,971	18	,825
	BRQ	,807	17	,003
	MNT	,950	18	,429

Prueba de homogeneidad de varianzas				
	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
<i>mdr1</i>	2,116	2	50	,131
<i>mdr2</i>	1,585	2	50	,215

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>mdr1</i>	Inter-grupos	10,568	2	5,284	2,410	,100
	Intra-grupos	109,625	50	2,192		
	Total	120,193	52			
<i>mdr2</i>	Inter-grupos	28,168	2	14,084	6,934	,002
	Intra-grupos	101,563	50	2,031		
	Total	129,731	52			

continúa...

4. Resultados

Tabla 15 (continuación)

Comparaciones múltiples
mdr2 HSD de Tukey

(I) Tejido	(J) Tejido	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
GD	BRQ	-1,6659	,4820	,003	-2,830	-,502
	MNT	-,2361	,4751	,873	-1,384	,911
BRQ	GD	1,6659	,4820	,003	,502	2,830
	MNT	1,4298	,4820	,013	,266	2,594
MNT	GD	,2361	,4751	,873	-,911	1,384
	BRQ	-1,4298	,4820	,013	-2,594	-,266

El test de Shapiro-Wilk se usa para contrastar la normalidad de un conjunto de datos, donde la hipótesis nula indica que la población está distribuida normalmente y, por tanto, si el nivel de significación es menor al deseado (0,05, en este caso), la hipótesis nula es rechazada, concluyendo que los datos no vienen de una distribución normal. Si el valor es superior, la hipótesis no se rechaza, por lo que los datos seguirían una distribución normal. Esta prueba es adecuada cuando el tamaño de la muestra es pequeño, como mucho 50. Si el tamaño muestral es mayor, se debería emplear el test de Komogorov-Smirnov.

Mediante la prueba de Levene, se analiza la homogeneidad de las varianzas. Se contrasta la hipótesis nula de que todas las varianzas son iguales; si el nivel de significación es menor a 0,05, se rechaza dicha hipótesis, aceptando que las varianzas son distintas y si es mayor al nivel de significación establecido, se aceptaría y se considerarían las varianzas iguales.

Los análisis de varianza (ANOVA), realizados con SPSS, examinan la hipótesis nula que compara las medias para ver si existen diferencias significativas. Cuando el nivel de significación es menor al establecido, se rechaza la hipótesis, considerando que sí existen diferencias entre los grupos.

Los resultados mostraron que las diferencias entre los tres tejidos, para el gen *mdr1*, no son significativos ($p = 0,1$), mientras que los resultados obtenidos

4. Resultados

para *mdr2* indicaban que existían diferencias de expresión al comparar los tejidos entre sí.

A continuación, se llevó a cabo un análisis *a posteriori* para ver entre que tejidos se produce este contraste. También se basa en comprobar si el nivel de significación (0,05 en este caso) que se obtiene tras el análisis es inferior al valor que se ha decidido, con lo que se rechazaría la hipótesis, considerando que existen diferencias entre los dos grupos. En esta ocasión se hizo el test HSD de Tukey, observándose diferencias significativas al comparar la branquia frente a los otros tejidos [branquia y glándula digestiva ($p = 0,003$); branquia y manto ($p = 0,013$)], mientras que entre los tejidos de glándula digestiva y manto no hubo diferencias ($p = 0,873$). Las variaciones de la expresión génica entre los

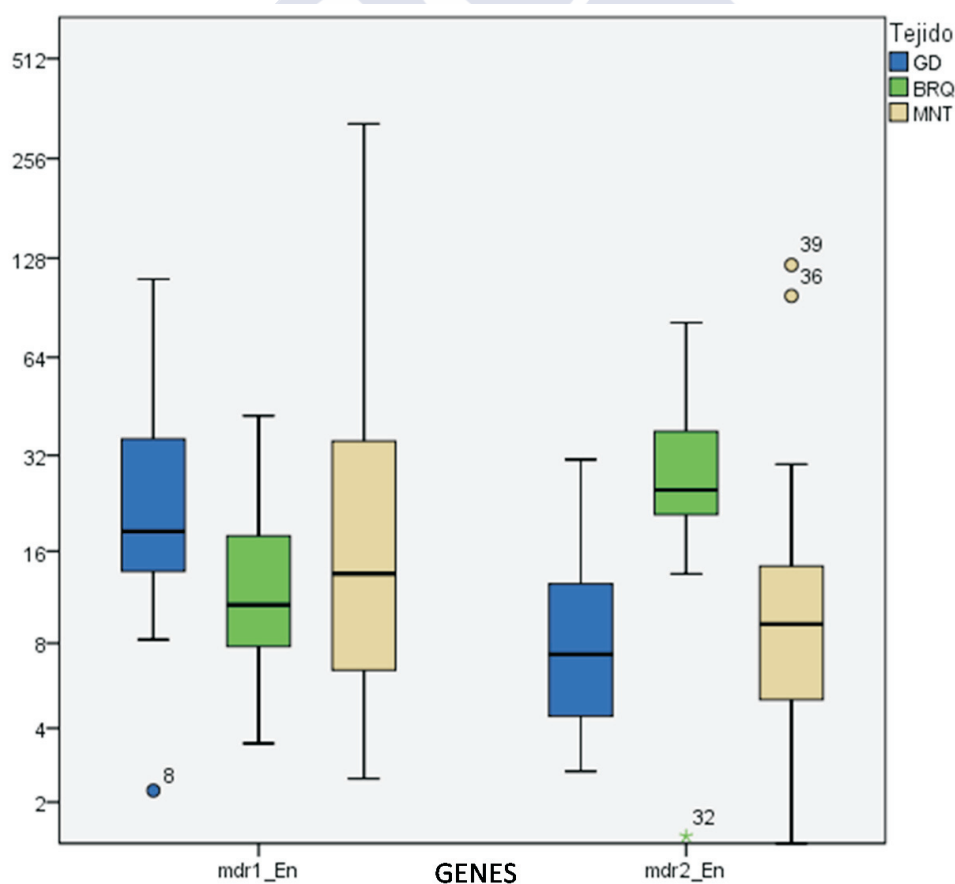


Figura 48: Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de expresión (en escala logarítmica base 2) de los genes *mdr* para las muestras donde se comparan los tres tejidos en *M. galloprovincialis* (GD: glándula digestiva, BRQ: branquia, MNT: manto). Los círculos representan los valores *outlier*, es decir, que caen fuera del intervalo esperado (valores con un rango intercuartil ente 1,5 y 3).

4. Resultados

tejidos se pueden observar en el gráfico de diagramas de caja (Figura 48). El rango y la distribución de los valores permiten una visualización de la variabilidad de los genes entre la glándula digestiva, las branquias y el manto, mostrando las diferencias de expresión entre los tejidos para los diversos genes. A la vista del gráfico de diagramas de caja, se puede deducir que los niveles de la *mdr2* para las branquias son más altos que en la glándula digestiva y el manto.

4.4.4. Comparación de la expresión de los genes *abcb* durante la presencia de un afloramiento de fitoplancton tóxico

Para observar la expresión de los genes a lo largo del ciclo de intoxicación por presencia de DSP, se compararon las muestras control frente a las diferentes situaciones que se dan durante el proceso. Para poder realizar el análisis estadístico (explicado previamente, en el apartado 3.4.5. *Análisis de los datos*), se tuvo que eliminar una muestra de Bueu3 (individuo 5 a profundidad de 10 m), debido a que no se produjo una correcta amplificación tras la reacción de PCR.

Tabla 16: Valores de Cq y eficiencias obtenidos con el iCycler en los tres tejidos por separado (glándula digestiva, branquia y manto). Estos datos se emplearon para realizar los estudios de expresión de los genes *mdr*; a lo largo de un episodio tóxico por DSP. Los valores en rojo fueron eliminados del análisis, ya que no amplificaron correctamente. Para la obtención de los valores de Cq, se utilizaron los umbrales de fluorescencia de 300 RFU en las muestras de glándula digestiva, 250 RFU en las de branquia y 200 RFU para el manto.

GLÁNDULA DIGESTIVA													
Muestra	Control		Muestra	Grove (0 días)		Bueu-1 (2 días)		Bueu-2 (10 días)		Bueu-3 (16 días)		Bueu-4 (79 días)	
	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>		<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>
C1	26,6	27,5	M1_1m	28,6	26,7	29,1	27,2	27,6	27,4	26,6	25,7	28,8	25,6
C2	29,1	28,5	M2_1m	29,4	29,2	28,4	28,4	28	28,6	30,2	29,4	29,5	30
C3	29,6	29,2	M3_1m	28,2	28	28,3	26,9	25,3	24,5	27,5	28,7	30,2	29,5
C4	30,8	28,7	M4_1m	27,8	28,2	26,7	27	27,4	28,6	28,3	27,6	28,5	27,2
C5	29,8	28,9	M5_1m	26,9	26,8	28,6	26,6	28,8	26,6	28	28	28,2	29
C6	29,2	27,2	M1_5m	28	29,8	29	29,7	26,8	26,3	29,1	29	27,9	27,2
C7	30,2	29	M2_5m	30,2	29,3	28,8	26,9	26,9	28,5	26,5	26	29,7	28,1

continúa...

4. Resultados

Tabla 16 (continuación)

GLÁNDULA DIGESTIVA													
Muestra	Control		Muestra	Grove (0 días)		Bueu-1 (2 días)		Bueu-2 (10 días)		Bueu-3 (16 días)		Bueu-4 (79 días)	
	mdr1	mdr2		mdr1	mdr2	mdr1	mdr2	mdr1	mdr2	mdr1	mdr2	mdr1	mdr2
C8	32	26,7	M3_5m	29,5	29,3	30,5	28,8	28	28,1	25,9	26,3	28	27,2
C9	29,9	27,8	M4_5m	27,1	25,9	28,1	26,2	28,9	27,9	26,4	25,7	26,4	26,3
C10	28,7	26,6	M5_5m	28	26	28,9	27,7	31,3	29,7	26,9	28,1	25,9	25,5
C11	32,8	30,3	M1_10m	28,4	28,2	27,5	27,9	28,4	28,9	27,5	28	28,2	29,3
C12	31	29,4	M2_10m	28,6	28,7	29,2	29,7	30,1	28,2	28,2	28	29,3	28,2
C13	30,6	28,8	M3_10m	33,4	31	26,1	25,9	28,9	28	25,8	27,4	28,9	27,2
C14	29	27	M4_10m	28,3	26,9	28,2	28	27,9	27,8	26,1	26,4	28,9	29,9
C15	29,3	28,5	M5_10m	27,6	26,5	28,9	29,2	26,9	27,3	38	N/A	27,9	27,9
C16	28	27,2											
C17	28	24,6											
C18	29,9	31,6											
	mdr1	mdr2											
	1,001	0,998	← Eficiencia										

BRANQUIA													
Muestra	Control		Muestra	Grove (0 días)		Bueu-1 (2 días)		Bueu-2 (10 días)		Bueu-3 (16 días)		Bueu-4 (79 días)	
	mdr1	mdr2		mdr1	mdr2	mdr1	mdr2	mdr1	mdr2	mdr1	mdr2	mdr1	mdr2
C1	28,2	25	M1_1m	28,5	25,4	28,9	24	28,2	24,9	26,1	22,3	29,8	26,3
C2	29	25,4	M2_1m	28,2	25,8	28,5	26,4	28,8	24,9	26,6	23,4	28,3	22,8
C3	29	25,4	M3_1m	26,9	23,8	29,1	25,1	28,1	24,8	27,4	23,6	28,4	24,1
C4	30	26,4	M4_1m	27,5	24,3	23,5	22	28	24,9	25,2	22,3	28,6	25,3
C5	29,6	24,2	M5_1m	25,9	22,7	27,9	25,8	28,6	24,1	27,1	23,8	28,9	25,7
C6	30,8	24,3	M1_5m	29,3	24,9	25,6	22	26,5	23,4	26	24,9	25,3	22,2
C7	28,8	25,2	M2_5m	27,1	24,2	26,8	23,7	26,3	23,6	26,9	23,7	24,1	20,9
C8	28,4	23,7	M3_5m	26,9	23,8	28,8	23,3	27	24,9	27,6	24,4	26,9	23,5

continúa...

4. Resultados

Tabla 16 (continuación)

BRANQUIA													
Muestra	Control		Muestra	Grove (0 días)		Bueu-1 (2 días)		Bueu-2 (10 días)		Bueu-3 (16 días)		Bueu-4 (79 días)	
	mdr1	mdr2		mdr1	mdr2	mdr1	mdr2	mdr1	mdr2	mdr1	mdr2	mdr1	mdr2
C1	28,2	25	M1_1m	28,5	25,4	28,9	24	28,2	24,9	26,1	22,3	29,8	26,3
C9	30,2	25,5	M4_5m	24,9	22,5	25,8	23,4	29,6	24,4	26,3	22,8	26,6	23
C10	31,3	25,1	M5_5m	27,9	23,2	30,7	25,5	30,7	24,8	26,8	23	26,6	23,5
C11	28,8	25,3	M1_10m	27,3	23,1	27,2	23,6	26,3	25	26,8	24	27,9	24,9
C12	28,2	24,4	M2_10m	27,9	24,8	29,5	26	28,9	23,9	26,2	21,8	28,9	25,5
C13	30,2	26,1	M3_10m	28,6	23,8	27,3	24,1	27,9	23,2	26	23,5	27,3	23
C14	32,7	29	M4_10m	26,7	23,3	27,3	24,2	26,1	23	26,7	24,5	27,3	23,6
C15	28,5	25	M5_10m	28,1	25,3	24,8	22,5	23,9	21,9	25,5	23,2	27,9	24,1
C16	28,6	25,2											
C17	28,9	25,1											
C18	28,4	23,8											
	mdr1	mdr2											
	1,116	1,051	← Eficiencia										

MANTO													
Muestra	Control		Muestra	Grove (0 días)		Bueu-1 (2 días)		Bueu-2 (10 días)		Bueu-3 (16 días)		Bueu-4 (79 días)	
	mdr1	mdr2		mdr1	mdr2	mdr1	mdr2	mdr1	mdr2	mdr1	mdr2	mdr1	mdr2
C1	29,7	25,7	M1_1m	28,6	26,8	30,7	26,8	29	28,6	30,2	24,9	29,6	26,8
C2	31,1	26,7	M2_1m	30,4	27,2	28,7	27,4	29,6	26,1	28,1	25,8	29,7	26,8
C3	26,7	25,2	M3_1m	28,3	25,4	28,6	26,5	29,9	26,9	28,4	26,7	29,9	27,1
C4	28	29,9	M4_1m	29,5	28,3	28,3	25,4	30,2	26,3	28,4	25,1	30	26
C5	29,7	28,1	M5_1m	26,9	26	29,7	25	29,2	25,9	29	27,2	27,2	26,1
C6	27,8	26,2	M1_5m	29,3	26,9	28,5	24	28,8	26,6	28,3	27	29,8	25,9
C7	31	26,9	M2_5m	28,1	24,7	28,3	26,2	30,1	26,5	29,4	26,3	27,2	26,1

continúa...

4. Resultados

Tabla 16 (continuación)

Muestra	MANTO												
	Control		Muestra	Grove (0 días)		Bueu-1 (2 días)		Bueu-2 (10 días)		Bueu-3 (16 días)		Bueu-4 (79 días)	
	mdr1	mdr2		mdr1	mdr2	mdr1	mdr2	mdr1	mdr2	mdr1	mdr2	mdr1	mdr2
C8	29,3	26	M3_5m	27,3	26,1	28	26,4	31,2	26,4	28,3	26,8	28,2	26,4
C9	28,8	25,5	M4_5m	30,2	29,2	29,3	24,1	26,9	25,1	27,8	26,2	28,2	25,2
C10	28,8	27	M5_5m	30,6	27,7	28	27,7	29,6	25,9	29,4	27,3	28,7	24,9
C11	27,9	26,4	M1_10m	30,2	27	28,7	26,5	28,6	24,7	29,5	27,4	30,7	26,6
C12	29	27,3	M2_10m	29,1	26,8	29,2	26,2	29,1	24	28,9	26,6	29,9	26,2
C13	30	28,7	M3_10m	30	27,2	28,5	26,7	30,9	26	28,3	26,1	30,5	25,3
C14	29,1	26,8	M4_10m	30,1	27,4	26,6	26	29,7	27,7	29,2	25,3	31	28,3
C15	28,1	28,4	M5_10m	28,9	26,7	28	25,3	28,7	26,3	28,4	25	25,7	26,1
C16	29,3	25,9											
C17	29,3	27,3											
C18	30,7	26,9											
	mdr1	mdr2											
	1,089	0,917											

← Eficiencia

Los datos de expresión (calculados con los valores de Cq y eficiencia, que se pueden consultar en la Tabla 16 y el Anexo 8.4.) fueron evaluados, primero, con el programa REST (Relative expression software tool) versión 2.0.7 (Pfaffl *et al.*, 2002). La expresión de los genes de estudio se normalizó por el conjunto de genes seleccionados anteriormente: *gapdh*, *rps4* y *cox1* para la glándula digestiva y las branquias, mientras que para el manto se eligieron *cox1*, *rps27* y *rps4*. Cada par de cebadores presentó diferencias en la eficiencia de amplificación con valores que van desde 0,859 (*cox1* en la glándula digestiva) a 1,116 (mdr1 gen en la branquia) (Tabla 9, Tabla 13 y Anexo 8.4.), siempre muy próximos al valor esperado, que sería 1, y además resultados adecuados para hacer la posterior comparación. La máxima eficiencia de la PCR se considera como E = 1, donde, en cada ciclo, cada secuencia molde presente sería replicada, mientras que el valor mínimo sería E = 0, que correspondería a que no se produce ninguna replicación.

4. Resultados

El programa REST solo permite comparar las diferencias de expresión entre dos casos. Por esta razón, para llevar a cabo el análisis, se realiza comparando cada una de las situaciones frente al control. El software realiza un test de aleatorización con 50.000 réplicas entre las muestras de los controles, frente a los grupos. La expresión relativa de las 2 *mdr* en *M. galloprovincialis* para cada uno de los tres tejidos (glándula digestiva, branquias y manto) se examinó usando los tres genes de referencia, elegidos para cada tejido, para efectuar la normalización (apartado 4.4.2. Estabilidad de los genes de referencia).

El análisis final mostró que las expresiones de ambos genes *mdr* son estables en el manto, al comparar todas las situaciones frente al control, mientras que los resultados obtenidos para la glándula digestiva y las branquias mostraron una regulación de la mayoría de estos genes, cuando hay presencia de ácido okadaico. En ambos tejidos, la *mdr1* se sobre-expresa cuando se comparan todas las situaciones frente al control, mientras que para la *mdr2* se observó una expresión significativamente mayor, en branquia, cuando se analizaron las muestras Bueu 1, 2 y 3 frente al control. En cambio, en glándula digestiva solo se observan diferencias estadísticamente significativas en el caso del control comparado con Bueu 3 (Tabla 17). Los niveles más elevados de ambos genes, cuando hay sobre-expresión, se observan cuando la concentración de ácido okadaico alcanza el valor máximo, es decir, en la muestra Bueu 3.

Tabla 17: Resultados obtenidos tras realizar un análisis con el programa REST. La expresión indica cuantas veces hay más o menos presencia del gen en cada situación y P(H1) indica si esa diferencia es significativa ($P < 0,05$). La flecha en el cuadro de resultado refleja si es un gen sobreexpresado (\uparrow) o infraexpresado (\downarrow). Grove: 0 días, Bueu 1: 2 días, Bueu 2: 10 días, Bueu 3: 16 días, Bueu 4: 72 días.

	GLÁNDULA DIGESTIVA					
	Gen	Expresión	Error Std.	95% C.I.	P(H1)	Resultado
Control vs. Grove	<i>mdr1</i>	2.14	0.761 - 5.776	0.169 - 20.579	0.015	\uparrow
	<i>mdr2</i>	1.173	0.510 - 2.858	0.204 - 4.371	0.464	
Control vs. Bueu 1	<i>mdr1</i>	2.27	0.821 - 5.676	0.307 - 19.709	0.004	\uparrow
	<i>mdr2</i>	1.286	0.457 - 3.443	0.175 - 6.588	0.292	
Control vs. Bueu 2	<i>mdr1</i>	2.944	1.010 - 8.252	0.411 - 29.534	0.001	\uparrow
	<i>mdr2</i>	1.22	0.541 - 2.671	0.230 - 7.038	0.371	

continúa...

4. Resultados

Tabla 17 (continuación)	GLÁNDULA DIGESTIVA					
	Gen	Expresión	Error Std.	95% C.I.	P(H1)	Resultado
Control vs. Bueu 3	<i>mdr1</i>	4.755	1.516 - 12.645	0.616 - 45.721	0	↑
	<i>mdr2</i>	1.672	0.692 - 4.200	0.317 - 7.208	0.029	↑

	BRANQUIA					
	Gen	Expresión	Error Std.	95% C.I.	P(H1)	Resultado
Control vs. Grove	<i>mdr1</i>	1.679	0.712 - 4.314	0.265 - 11.832	0.037	↑
	<i>mdr2</i>	0.959	0.460 - 2.143	0.158 - 3.604	0.842	
Control vs. Bueu 1	<i>mdr1</i>	2.656	0.782 - 8.680	0.275 - 27.117	0	↑
	<i>mdr2</i>	1.514	0.630 - 3.654	0.250 - 7.606	0.023	↑
Control vs. Bueu 2	<i>mdr1</i>	2.479	0.706 - 8.301	0.242 - 28.879	0	↑
	<i>mdr2</i>	1.454	0.616 - 3.631	0.247 - 8.253	0.044	↑
Control vs. Bueu 3	<i>mdr1</i>	5.293	2.635 - 12.028	0.917 - 22.890	0	↑
	<i>mdr2</i>	2.422	1.298 - 4.757	0.528 - 8.427	0	↑

	MANTO					
	Gen	Expresión	Error Std.	95% C.I.	P(H1)	Resultado
Control vs. Grove	<i>mdr1</i>	1.118	0.273 - 4.425	0.078 - 16.535	0.696	
	<i>mdr2</i>	1.298	0.424 - 4.259	0.183 - 9.815	0.267	
Control vs. Bueu 1	<i>mdr1</i>	0.89	0.220 - 3.483	0.064 - 13.219	0.686	
	<i>mdr2</i>	1.134	0.385 - 3.127	0.198 - 6.925	0.542	
Control vs. Bueu 2	<i>mdr1</i>	0.89	0.220 - 3.483	0.064 - 13.219	0.686	
	<i>mdr2</i>	1.134	0.385 - 3.127	0.198 - 6.925	0.542	
Control vs. Bueu 3	<i>mdr1</i>	0.841	0.217 - 2.993	0.064 - 10.871	0.535	
	<i>mdr2</i>	1.053	0.361 - 3.025	0.185 - 6.759	0.807	

Los resultados pueden ser interpretados observando los valores de la Tabla 17. La prueba de hipótesis P(H1) representa la probabilidad de la hipótesis alternativa, indicando si la diferencia entre las muestras y el grupo control se debe solo al azar y proporciona una medida sobre si el resultado es estadísticamente significativo.

4. Resultados

Los análisis por remuestreo o *bootstrapping* se utilizan para proporcionar un 95% de intervalo de confianza para los coeficientes de la expresión. Cuando los valores de $P(H1)$ son inferiores a 0,05, se considera que el grupo de muestra es significativamente diferente al grupo control (Pfaffl, 2002), mientras que los valores de expresión indican la magnitud de la diferencia de los genes estudiados, es decir, entre el grupo control y las diferentes situaciones analizadas. Los resultados inferiores a 1 son las subexpresadas, mientras que las superiores a 1 serán sobreexpresadas.

Las gráficas creadas con el programa SPSS nos permiten hacernos una idea de los cambios de la expresión génica a lo largo de la exposición tóxica (Figura 49, en la página siguiente). Se puede ver, al igual que en los resultados obtenidos con el REST (Tabla 17), como, en la glándula digestiva y en la branquia, los niveles de expresión van aumentando con el paso de los días y se incrementa la concentración de toxina, hasta llegar al máximo (Bueu 3 - 16 días).

En el último muestreo se produce un descenso de la expresión, asociado a que las concentraciones de ácido okadaico volvieron a disminuir. Esto ocurre para los dos genes analizados, siendo mucho más destacado en *mdr1* que en *mdr2*. Si nos fijamos en los resultados obtenidos para el manto, podemos observar que, en ambos genes, apenas hay cambios entre los distintos muestreos.

Las expresiones relativas de los genes de estudio se normalizaron mediante los tres mejores genes de referencia para cada tejido, como se hizo con el análisis REST. Los valores obtenidos también fueron analizados, llevando a cabo un estudio estadístico, que se realizó con IBM SPSS 19 software.

Los datos obtenidos se transformaron al logaritmo en base 2 de la expresión relativa normalizada para poder trabajar con unos valores que presenten una distribución normal. Esto fue confirmado por la prueba de Shapiro-Wilk (el resultado corrobora la normalidad de la mayoría de los datos, con lo que se aceptaron los valores obtenidos para continuar el análisis). También se comprobó la homogeneidad de las varianzas, mediante la prueba de Levene (el resultado se muestra en la Tabla 18, situada después de la figura 49).

4. Resultados

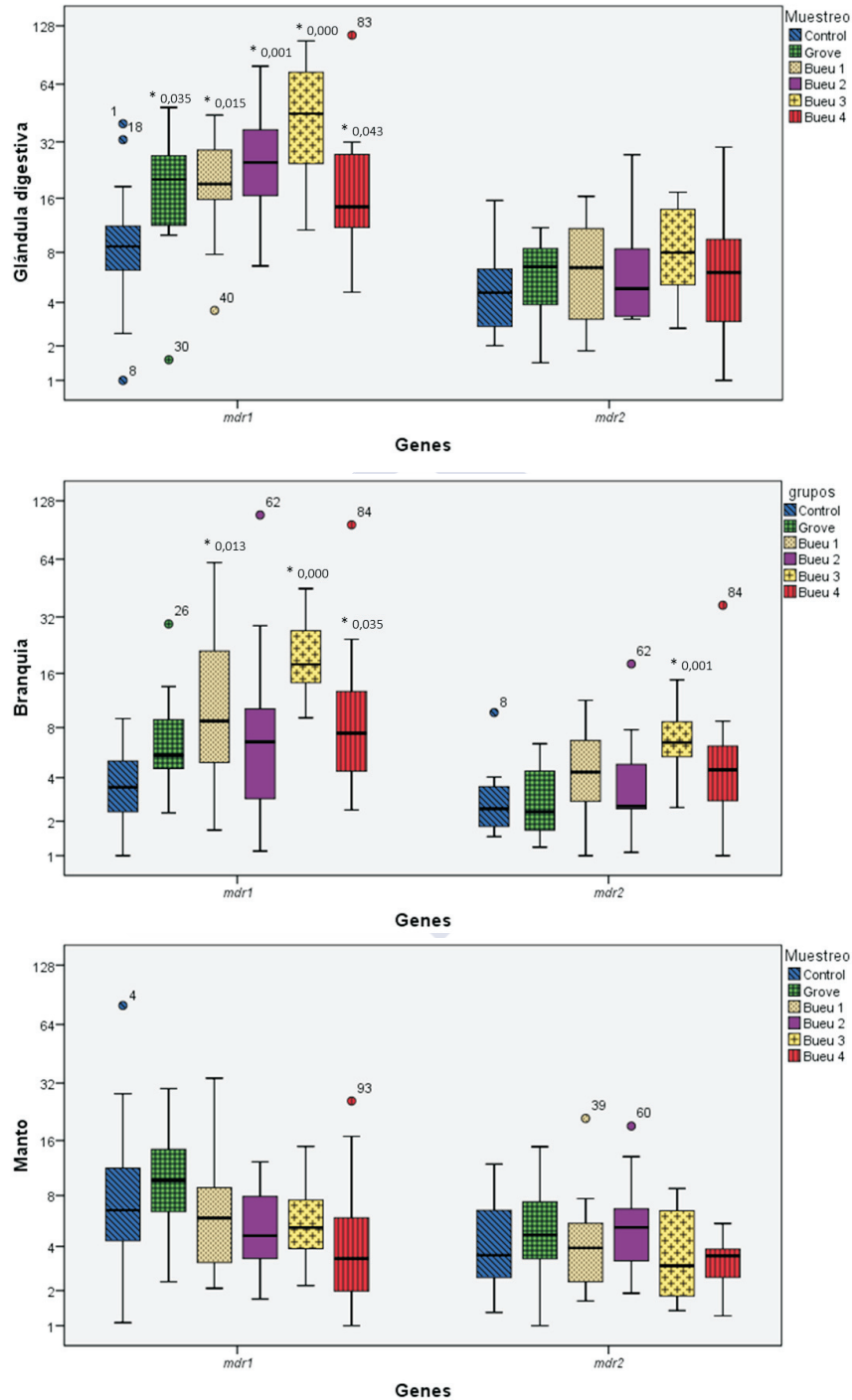


Figura 49: Niveles de expresión (a partir de valores con la expresión normalizada, representados en escala logarítmica base 2) de las dos MDR, para los tres tejidos, donde se puede observar como varía a lo largo de la evolución del episodio tóxico, causado por *Dinophysis acuminata*. Grove: 0 días, Bueu 1: 2 días, Bueu 2: 10 días, Bueu 3: 16 días, Bueu 4: 72 días. Los círculos representan los valores *outlier*, es decir, que caen fuera del intervalo esperado (valores con un rango intercuartil ente 1,5 y 3). Los asteriscos indican aquellos muestreos que son significativamente diferentes al control, según el test bilateral de Dunnet (con sus valores de significación).

4. Resultados

Tabla 18: Análisis estadístico de los resultados de las dos *mdr*, para los tres tejidos. Pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y de homogeneidad de varianzas (Levene). Grove: 0 días, Bueu 1: 2 días, Bueu 2: 10 días, Bueu 3: 16 días, Bueu 4: 72 días.

GLÁNDULA DIGESTIVA				
	Muestreo	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
<i>mdr1</i>	Control	0,943	18	0,331
	Grove	0,846	14	0,02
	Bueu 1	0,919	15	0,186
	Bueu 2	0,987	14	0,998
	Bueu 3	0,95	13	0,596
	Bueu 4	0,944	13	0,508
<i>mdr2</i>	Control	0,953	18	0,473
	Grove	0,88	14	0,059
	Bueu 1	0,919	15	0,187
	Bueu 2	0,873	14	0,046
	Bueu 3	0,921	13	0,26
	Bueu 4	0,985	13	0,995

Test de Levene - Prueba de homogeneidad de varianzas				
	Estadístico de Levene (F)	gl1	gl2	Sig.
<i>mdr1</i>	0,136	5	81	0,983
<i>mdr2</i>	1,315	5	81	0,266

BRANQUIA				
	Muestreo	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
<i>mdr1</i>	Control	0,975	18	0,888
	Grove	0,945	15	0,447
	Bueu 1	0,982	15	0,98

continúa...

4. Resultados

Tabla 18 (continuación)		BRANQUIA		
	Muestreo	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
<i>mdr1</i>	Bueu 2	0,961	15	0,71
	Bueu 3	0,935	15	0,318
	Bueu 4	0,914	15	0,158
<i>mdr2</i>	Control	0,876	18	0,023
	Grove	0,937	15	0,351
	Bueu 1	0,976	15	0,937
	Bueu 2	0,916	15	0,168
	Bueu 3	0,971	15	0,866
	Bueu 4	0,941	15	0,389

Test de Levene - Prueba de homogeneidad de varianzas				
	Estadístico de Levene (F)	gl1	gl2	Sig.
<i>mdr1</i>	2,109	5	87	0,072
<i>mdr2</i>	0,874	5	87	0,502

		MANTO		
	Muestreo	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
<i>mdr1</i>	Control	0,976	18	0,903
	Grove	0,975	15	0,923
	Bueu 1	0,959	15	0,682
	Bueu 2	0,943	15	0,417
	Bueu 3	0,98	15	0,969
	Bueu 4	0,927	15	0,244
<i>mdr2</i>	Control	0,96	18	0,594
	Grove	0,966	15	0,792

continúa...

4. Resultados

Tabla 18 (continuación)		MANTO		
	Muestreo	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
<i>mdr2</i>	Bueu 1	0,923	15	0,212
	Bueu 2	0,963	15	0,745
	Bueu 3	0,9	15	0,094
	Bueu 4	0,916	15	0,164

Test de Levene - Prueba de homogeneidad de varianzas				
	Estadístico de Levene (F)	gl1	gl2	Sig.
<i>mdr1</i>	1,457	5	87	0,212
<i>mdr2</i>	0,907	5	87	0,48

A continuación, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) entre grupos, con el fin de comprobar las posibles diferencias de expresión, al comparar el control y los diferentes muestreos con afloramiento de plancton tóxico. Las diferencias se consideraron significativas para valores de $p < 0,05$ (Tabla 19). A los genes que, tras el análisis, presentan diferencias significativas, se les aplicó el test *a posteriori* de Tukey, que lleva a cabo una comparación de todas las situaciones entre ellos. También se realizó la prueba t de Dunnett, ya que permite utilizar un grupo como control y comparar todos los otros frente a él. Estos análisis *post-hoc* (Tabla 19) se emplearon cuando el análisis ANOVA indicó que existía una diferencia significativa entre los casos estudiados, pero es desconocido dónde se encontraba la variación.

Cuando el valor de significación es menor a 0,05, la hipótesis nula fue rechazada. Esto se interpreta como que las medias poblacionales comparadas no son iguales y, por lo tanto, existe una diferencia significativa entre las situaciones. Para la glándula digestiva y las branquias, tras la prueba de ANOVA de un factor, la *mdr1* presentó diferencias significativas para ambos tejidos, con $p=0,000$ en glándula digestiva y en branquia.

4. Resultados

En cambio, para la *mdr2* solo presentó diferencias en la expresión la branquia con $p=0,001$, mientras que en glándula digestiva el resultado obtenido no fue significativo ($p=0,505$). En el análisis del manto, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los genes *mdr* cuando se comparó el control frente a los demás muestreos. Los valores de nivel de significación, tras el análisis de la varianza (ANOVA), fueron $p=0,063$ para la *mdr1* y $p=0,117$ para la *mdr2*, por lo que no se realizó ningún test *a posteriori* para este tejido (Véase Tabla 19, a continuación).

Tabla 19: Resultados del análisis de varianza (ANOVA), realizadas con el programa IBM SPSS 19, para los tres tejidos (gl: grados de libertad; Sig.: nivel de significación- $p<0,05$; F: variación entre grupos).

ANOVA		GLÁNDULA DIGESTIVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>mdr1</i>	Inter-grupos	41,914	5	8,383	6,773	0
	Intra-grupos	100,253	81	1,238		
	Total	142,167	86			
<i>mdr2</i>	Inter-grupos	4,487	5	0,897	0,87	0,505
	Intra-grupos	83,572	81	1,032		
	Total	88,059	86			

ANOVA		BRANQUIA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>mdr1</i>	Inter-grupos	50,82	5	10,164	6,679	0
	Intra-grupos	132,396	87	1,522		
	Total	183,217	92			
<i>mdr2</i>	Inter-grupos	18,987	5	3,797	4,335	0,001
	Intra-grupos	76,209	87	0,876		
	Total	95,196	92			

continúa...

4. Resultados

Tabla 19 (continuación)

ANOVA		MANTO				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>mdr1</i>	Inter-grupos	14,406	5	2,881	2,188	0,063
	Intra-grupos	114,581	87	1,317		
	Total	128,987	92			
<i>mdr2</i>	Inter-grupos	7,402	5	1,48	1,82	0,117
	Intra-grupos	70,764	87	0,813		
	Total	78,166	92			

Para los genes donde se observó que existían diferencias, se llevó a cabo un análisis más exhaustivo, con un par de pruebas *post hoc*, para así comparar las diferentes situaciones. La prueba HSD de Tukey muestra que hay variaciones en glándula digestiva, cuando se compara el grupo de control (Caramiñal) frente a las muestras de Bueu1 ($p=0,036$), Bueu2 ($p=0,002$), Bueu3 ($p=0,000$).

En branquia solo se obtuvieron valores con un nivel de significación menor a 0,05 al comparar el control contra Bueu1 ($p=0,033$) y Bueu3 ($p=0,000$) en la *mdr1*, mientras que, para la *mdr2*, solo una de las situaciones (control frente a Bueu3) fue significativa, con $p=0,003$.

También se encontraron diferencias significativas al analizar el muestreo Bueu 3 (16 días y cuando se encontró mayor concentración de toxina), al compararlo frente a Grove (0 días) y Bueu 2 (10 días), tanto en *mdr1* como en *mdr2*.

Las comparaciones múltiples realizadas con la prueba de Dunnett presentaron un resultado similar al HSD Tukey. La expresión de la *mdr1* en glándula digestiva es significativamente distinta, al comparar todos los casos frente al

4. Resultados

control: Grove ($p=0,035$), Bueu1 ($p=0,015$), Bueu2 ($p=0,001$), Bueu3 ($p=0,000$), Bueu4 ($p=0,043$).

En el caso de la branquia, se encontraron diferencias significativas en Bueu1 ($p=0,013$) y Bueu3 ($p=0,000$) y, además, se hallaron diferencias con Bueu4 ($p=0,034$). Para la *mdr2*, solo con Bueu 3 ($p=0,001$) (Véase la Tabla 20, a continuación).

Tabla 20: Análisis *post hoc* de comparaciones múltiples, HSD de tukey y t de Dunnet. Para comparar las diferencias entre las situaciones en aquellos genes donde se obtuvo un resultado del análisis de las varianzas significativo. Grove: 0 días, Bueu 1: 2 días, Bueu 2: 10 días, Bueu 3: 16 días, Bueu 4: 72 días.

Comparaciones múltiples HSD de Tukey									
	Variable dependiente		(I) Muestreo	(J) Muestreo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
								Límite inferior	Límite superior
GLÁND. DIGEST.	<i>mdr1</i>	HSD de Tukey	Control	Grove	-10.773	.3964	.083	-2.235	.080
				Bueu 1	-11.818	.3889	.036	-2.317	-.046
				Bueu 2	-15.566	.3964	.002	-2.714	-.399
				Bueu 3	-22.483	.4049	.000	-3.430	-1.066
				Bueu 4	-10.683	.4049	.100	-2.250	.114
BRAN-QUIA	<i>mdr1</i>	HSD de Tukey	Control	Grove	-.7479	.4313	.513	-2.005	.509
				Bueu 1	-13.239	.4313	.033	-2.581	-.067
				Bueu 2	-.8266	.4313	.399	-2.083	.430
				Bueu 3	-24.046	.4313	.000	-3.661	-1.148
				Bueu 4	-11.692	.4313	.083	-2.426	.088
			Bueu 3	Control	24.046	.4313	.000	1.148	3.661
				Grove	16.567	.4505	.005	.344	2.969

continúa...

4. Resultados

Tabla 20 (continuación)

Comparaciones múltiples
HSD de Tukey

	Variable dependiente		(I) Muestreo	(J) Muestreo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
								Límite inferior	Límite superior
BRAN-QUIA	<i>mdr1</i>	HSD de Tukey	Bueu 3	Bueu 1	10.807	.4505	.168	-.232	2.393
				Bueu 2	15.780	.4505	.009	.265	2.891
				Bueu 4	12.353	.4505	.077	-.077	2.548
BRAN-QUIA	<i>mdr2</i>	HSD de Tukey	Control	Grove	.0592	.3272	1.000	-.894	1.013
				Bueu 1	-.4681	.3272	.708	-1.422	.485
				Bueu 2	-.1781	.3272	.994	-1.132	.775
				Bueu 3	-12.768	.3272	.003	-2.230	-.323
				Bueu 4	-.6008	.3272	.448	-1.554	.353
			Bueu 3	Control	12.768	.3272	.003	.323	2.230
				Grove	13.360	.3418	.002	.340	2.332
				Bueu 1	.8087	.3418	.180	-.187	1.805
				Bueu 2	10.987	.3418	.022	.103	2.095
				Bueu 4	.6760	.3418	.363	-.320	1.672

T de Dunnett (bilateral)

	Variable dependiente	(I) Muestreo	(J) Muestreo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
							Límite inferior	Límite superior
GLÁND. DIGEST.	<i>mdr1</i>	Grove	Control	10.773	.3964	.035	.054	2.101
		Bueu 1	Control	11.818	.3889	.015	.178	2.186
		Bueu 2	Control	15.566	.3964	.001	.533	2.580

continúa...

4. Resultados

Tabla 20 (continuación)

T de Dunnett (bilateral)

	Variable dependiente	(I) Muestreo	(J) Muestreo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
							Límite inferior	Límite superior
GLÁND. DIGEST.	<i>mdr1</i>	Bueu 3	Control	22.483	.4049	.000	1.203	3.293
		Bueu 4	Control	10.683	.4049	.043	.023	2.113
BRAN-QUIA	<i>mdr1</i>	Grove	Control	.7479	.4313	.302	-.361	1.857
		Bueu 1	Control	13.239	.4313	.013	.215	2.433
		Bueu 2	Control	.8266	.4313	.216	-.283	1.936
		Bueu 3	Control	24.046	.4313	.000	1.295	3.514
		Bueu 4	Control	11.692	.4313	.035	.060	2.279
	<i>mdr2</i>	Grove	Control	-.0592	.3272	1.000	-.901	.782
		Bueu 1	Control	.4681	.3272	.487	-.374	1.310
		Bueu 2	Control	.1781	.3272	.978	-.664	1.020
		Bueu 3	Control	12.768	.3272	.001	.435	2.118
		Bueu 4	Control	.6008	.3272	.251	-.241	1.442

4.4.5. Análisis de correlación

A partir de los datos, de la concentración de ácido okadaico y de las medidas de expresión (Cq) de los dos genes *mdr*, obtenidas en los tres tejidos, se llevó a cabo un análisis de correlación lineal de Pearson. El coeficiente derivado del análisis, mide la relación de las dos variables aleatorias cuantitativas.

El resultado indicó que los niveles de expresión de ambos genes de estudio presentan una correlación positiva frente a la cantidad de concentración, tanto en glándula digestiva como en la branquia, mientras que para el manto sería negativa. Solo en la glándula digestiva y para el gen *mdr1* sería significativo: *mdr1* ($r=0,55$ y $p=0,000$), según se muestra en la Tabla 21. Que exista una correlación positiva indica que se observa una dependencia de relación directa entre las dos variables, es decir, cuando una de ellas aumenta, la otra también.

4. Resultados

Esto supone que, con un incremento de la concentración de ácido okadaico, los valores que reflejan los niveles de expresión serán mayores.

Tabla 21. Resultados del análisis de correlación Pearson (r), entre la concentración de ácido okadaico y la expresión de los dos genes *mdr*, en los tres tejidos.

		Expresión					
		Glándula digestiva		Branquia		Manto	
		<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>
Concentración	r	,550	,141	,182	,178	-,141	-,106
	Sig. (bilateral)	,000	,229	,118	,127	,229	,366
	N	74	74	75	75	75	75

También se hizo un análisis gráfico, donde se comparó la variación de Cq, en los distintos tejidos y, para los dos genes *mdr*, se calculó la expresión media referenciada al control para obtener un valor que indicase cuantas veces más se expresa cada gen en los distintos tejidos (Tabla 22), frente a las concentraciones de ácido okadaico [ng/g] medidas en la glándula digestiva de cada muestra.

Tabla 22: Expresión media de los genes en los distintos tejidos, referenciados al control.

Muestra	Días con toxina	Glándula digestiva		Branquia		Manto	
		<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>	<i>mdr1</i>	<i>mdr2</i>
Grove	0	1,9527509	1,0873042	1,6755627	0,9231596	0,9844005	1,5163403
Bueu1	2	1,9498272	1,3603439	3,1423438	1,405942	0,734006	1,0527523
Bueu2	10	2,6423326	1,2611437	3,0889423	1,2775526	0,7109716	1,5287591
Bueu3	16	4,3034693	1,6523734	4,6040657	2,225174	0,5117781	0,9322671
Bueu4	79	2,1516132	1,5089212	3,0670298	1,9070784	0,6004964	0,9406529

Esto permitió observar como, en glándula digestiva y en branquia, *mdr1* sigue una dinámica similar a la presencia de toxina en los individuos (principalmente, en la glándula digestiva, donde prácticamente se solapa con la recta que mide la concentración de ácido okadaico). También se puede ver que ocurre algo parecido con *mdr2*, pero no es tan marcado. Por otra parte, en manto, no se ve que haya ningún tipo de variación por la presencia de la toxi-

4. Resultados

na. Otro dato interesante que se puede extraer, tras analizar el gráfico, es que, en la branquia, parece que se produce una respuesta inmediata cuando los individuos entran en contacto con este tipo de contaminantes, aumentando desde un primer momento la expresión de *mdr1*.

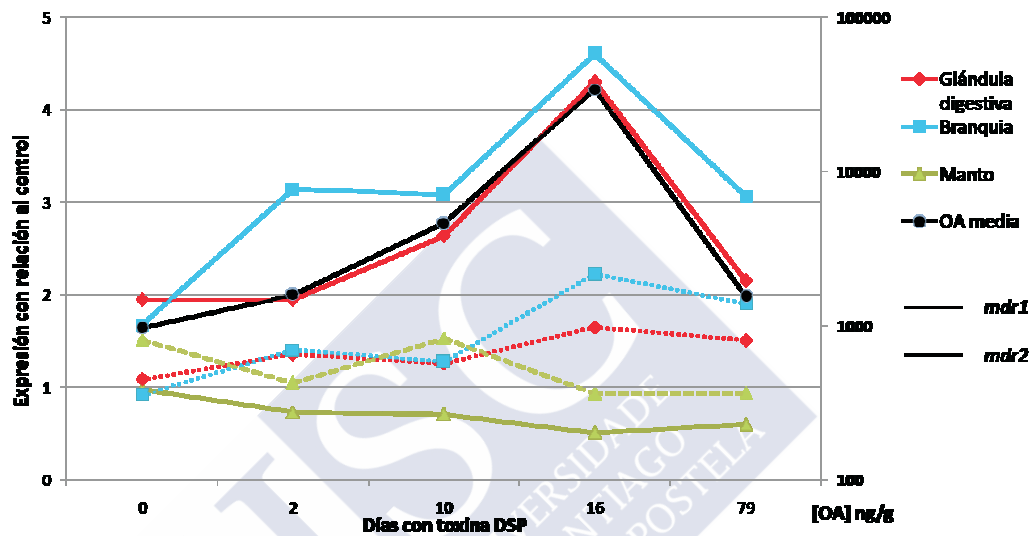


Figura 50: Gráfico que representa como evolucionó la concentración media de ácido okadaico en los muestreos (medida en glándula digestiva), comparada con la expresión media de los dos genes *mdr* (*mdr1*, representado con una línea continua; *mdr2*, con línea punteada) en los distintos tejidos (glándula digestiva, en rojo; branquia, en azul y manto, en verde) referenciados al control (en escala logarítmica en base 10).



5. DISCUSIÓN

5.1. Obtención del cDNA que codifica para proteínas MDR y caracterización de estas

Los transportadores ABC y su actividad han sido ampliamente investigados, principalmente en relación con la multirresistencia frente a fármacos en cánceres humanos, pero, hasta la fecha, no se han realizado muchos trabajos que estudiaran su relación con las situaciones ambientales. Las investigaciones en este campo se han trasladado a las especies marinas, debido a que estas son capaces de tolerar altos niveles de xenobióticos ambientales, tanto naturales como antropogénicos.

La acumulación en los moluscos bivalvos de algunas toxinas, producidas por ciertas especies de microalgas, constituye un grave inconveniente, que conlleva importantes problemas económicos y de salud. Por esta razón, se están llevando a cabo numerosas investigaciones que han tratado de obtener información sobre las proteínas transportadoras de membrana, con el fin de procurar comprender si estas podrían estar involucradas en los procesos de desintoxicación.

La multirresistencia frente a xenobióticos (MXR) en organismos acuáticos expuestos a toxinas o contaminantes antropogénicos es un fenómeno análogo a la multirresistencia a fármacos (MDR) observada en líneas celulares tumorales resistentes a drogas anticancerígenas (Endicott & Ling, 1989; Kurelec, 1992). Esta resistencia se debe en parte al elevado nivel de expresión de ciertas proteínas transportadoras de membrana, pertenecientes a la superfamilia de proteínas ABC, particularmente a la P-glucoproteína (P-gp, ABCB1, MDR1) y a la *multidrug resistance-related protein* (MRP) (Bard, 2000).

Existen diversas evidencias de su funcionamiento en bivalvos marinos (Eufemia & Epel, 2000; McFaden *et al.*, 2000; Smital *et al.*, 2000; Pain & Parant, 2003a; Franzelliti & Fabbri, 2006), que demuestran la inducción del sistema frente a diversos contaminantes. Sin embargo, apenas hay referencias en relación con su posible papel en la eliminación de toxinas durante los procesos de

5. *Discusión*

desintoxicación celular en moluscos, asociados a los episodios tóxicos por fitotoxinas lipofólicas, concretamente el ácido okadaico y sus derivados. Se ha considerado a la P-gp como una candidata a participar en la expulsión de este tipo de toxinas de las células de moluscos, ya que la estructura molecular de este compuesto cuadra perfectamente en el diseño de la amplia variedad de metabolitos que pueden unir y llevar hacia fuera de la célula estos transportadores de membrana. Además, en diversas líneas de células tumorales humanas resistentes a elevadas concentraciones de ácido okadaico, se ha puesto de manifiesto que esta resistencia se debe a la sobreexpresión del gen de la P-glicoproteína (*P-gp*) (Ritz *et al.*, 1999).

Por tanto, se ha propuesto la existencia de un sistema MXR en moluscos. El hecho de que el ácido okadaico presente una estructura molecular adecuada como posible sustrato de la P-gp, la evidencia de que el ácido okadaico es transportado por esta proteína de membrana en células de vertebrados y el carácter universal y conservado de este sistema de transporte de toxinas permiten, en conjunto, proponer la hipótesis de que estos transportadores podrían desempeñar un importante papel en la desintoxicación celular de moluscos, durante la presencia de episodios tóxicos.

Para confirmar esta hipótesis, se ha secuenciado el cDNA que codifica para dos proteínas MDR en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*. Se partió de muestras de manto. A estas se les extrajo el RNA, que se usó para una posterior síntesis de cDNA y del que se obtuvieron diferentes fragmentos por amplificación de determinadas regiones de las secuencias nucleotídicas, según los cebadores que se utilizaron.

Muchas veces, al intentar amplificar un fragmento, no se obtenía ningún producto tras 30-35 ciclos de PCR y, tras introducir la reacción en el termociclador otros 5-10 ciclos, ya se veían los fragmentos en el gel de agarosa. En numerosas ocasiones, no se observó ningún resultado tras las amplificaciones; otras veces, los productos obtenidos presentaban tamaños distintos a lo esperado; e incluso en bandas que fueron cortadas, tras todo el proceso de clonación para ser enviadas a secuenciar, se comprobaba que no presentaban semejanza con

5. Discusión

lo deseado. Además, el diseño de cebadores también influye de forma importante en la eficacia que se pueda alcanzar en la reacción. A lo largo de esta investigación, se diseñaron diferentes cebadores, que, tras numerosos intentos, tuvieron que ser descartados.

Por tanto, como se puede apreciar, el trabajo de amplificación y clonación para poder secuenciar los diferentes fragmentos que conforman las dos secuencias de los genes *mdr* fue más complicado de lo esperado. Además, para presentar una secuencia nucleotídica robusta, se procuró que todas las regiones amplificadas estuviesen compuestas por al menos 5 clones. Esto es debido a que los diferentes clones muchas veces difieren en algún nucleótido. Como no podemos decidir cuál de los nucleótidos es el frecuente, al tener varios clones, se puede elegir más fácilmente, ya que uno de ellos se repetirá más. Es interesante usar una cifra impar de clones, ya que así generalmente no habrá igualdad en el número nucleótidos y siempre nos podremos decantar por uno de ellos. Otro punto a tener en cuenta es que los distintos fragmentos tenían que solaparse entre ellos, facilitando así el ensamblado de la secuencia final (*contig*).

Las secuencias completas fueron obtenidas tras la unión de todos los fragmentos y la comparación con las bases de datos del EBI (*European Bioinformatics Institute*) y del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) confirmó un alto grado de identidad con el gen *ABCBI*, indicando que se trataban de genes que codificaban para proteínas ABC de la subfamilia B a la que pertenece la MDR, con un porcentaje de identidad en torno al 50% con las MDR de vertebrados. La primera en ser obtenida (*mdr1*) estaba formada por una secuencia de cDNA de 4271 pb y presenta un marco abierto de lectura de 3924 nucleótidos, que codifican para una proteína de 1307 aminoácidos. La segunda (*mdr2*) era un poco más grande (4417 pb), con un marco abierto de lectura de 4104 nucleótidos, que codifican para una proteína de 1367 aminoácidos.

Un posterior estudio de la secuencia, con herramientas bioinformáticas, muestra que las proteínas tienen la estructura típica de las proteínas transportadoras ABC completas con dos dominios transmembrana (TMD1 y TMD2),

5. Discusión

con 6 segmentos α -hélices en cada uno de ellos, que atraviesan la bicapa lipídica. En la parte extracelular de estas regiones, además, se pudieron localizar los posibles sitios de N-glicosilación. También existen dos dominios de unión al nucleótido (NBD1 y NBD2), con los motivos altamente conservados a través de la evolución y característicos de estas proteínas, tales como los Walker A y B, el motivo C o los distintos bucles o *loops* (Figura 40). Todos ellos fueron fácilmente localizados en las secuencias de cDNA obtenidas a partir de tejido del mejillón *M. galloprovincialis* (Luckenbach & Epel, 2008). También describieron una proteína MDR en el mejillón *M. californianus*, con la que sobre todo la MDR1 de *M. galloprovincialis* comparte un elevado grado de identidad de aminoácidos.

Ambas cuadran perfectamente con las descritas previamente en otras especies (principalmente humanos) por diversos investigadores, presentando los motivos conservados mencionados anteriormente, las zonas de glucosilación en la parte extracelular y las regiones terminales de la proteína hacia el citosol (Chen *et al.*, 1986; Higgins, 1992; Ambudkar *et al.*, 2006; Chouduri & Klaassen, 2006; Deeley *et al.*, 2006).

Además, se llevó a cabo un análisis de los distintos motivos conservados en ambas proteínas, comparándolas con otras ABCB de humanos y bivalvos, para estudiar si ciertos aminoácidos importantes se mantenían conservados en mejillón. Se emplea el alineamiento obtenido con el programa ClustalW, que es editado con GenDoc (Anexo 8.2.), para facilitar la localización de las regiones con mayor parecido. El *A-loop* mantiene como residuo aromático la tirosina (Y), en ambos NBD, de las dos proteínas. Los Walker A son prácticamente idénticos entre sí, cuando son comparados frente a los de las demás proteínas con la cisteína (C), implicada en la formación de los puentes disulfuro, presente en todos ellos. En el *Q-loop*, la glutamina conservada también aparece siempre, pero tres posiciones antes. En la MDR1, hay una valina (V) en el NBD1, al igual que en humanos, mientras que en la MDR2 es una isoleucina (I).

5. *Discusión*

Lo mismo ocurre en el NBD2, donde vuelve a haber valina en MDR1, e isoleucina en MDR2, pero, en este caso, en humanos encontramos isoleucina. El motivo C es prácticamente igual en todas las secuencias comparadas. Solo se ve una diferencia entre las de bivalvos y las de humanos: de nuevo cambia una valina (en bivalvos) por una isoleucina (humano). Estos aminoácidos son estructuralmente muy parecidos, por lo que la sustitución de uno por otro no debería provocar muchos cambios en la estructura de la proteína, aunque podría ser que afectase de algún modo a su funcionalidad. Tanto los Walker B como los *D-loop* están totalmente conservados, manteniéndose idénticos en todas las secuencias. Lo mismo ocurre con el *H-loop* del segundo NBD, que se mantiene IVIAHRL, que es igual a la secuencia presente en el primer NBD en humanos, pero que en mejillón cambia la primera isoleucina por una leucina, aminoácidos muy similares entre ellos.

Por último, se analizaron ciertos residuos, cuyas mutaciones provocan cambios en la actividad de la proteína (Frelet & Klein, 2006). Por ejemplo, en la glicina (G185 de la ABCB1 de humanos), produce cambios en la estructura y funcionalidad de la proteína; esta se mantiene conservada en mejillón (G190 en la MDR1 y G262 en MDR2). En cambio, la prolina P709, implicada en la integridad de la estructura de la proteína, en MDR2 se conserva (P797), pero en MDR1 es sustituida por glicina (G745). Aun así, se puede observar que apenas se producen cambios en las zonas conservadas y las sustituciones encontradas ocurren entre residuos, que suelen ser muy similares entre ellos, manteniendo las proteínas funcionales, a pesar de las diferencias encontradas.

Sería interesante que estos residuos fuesen estudiados en especies que presenten estas proteínas poco funcionales. Esto nos ayudaría a poder conocer si existen variaciones importantes, que pudiesen influir en la actividad de estos transportadores.

La presencia de proteínas transportadoras ABC, similares a hABCB1/MDR1 y hABCB4/MDR3, confirman la posibilidad de que estas proteínas en los mejillones, podrían tomar parte en la defensa contra agentes tóxicos. Estos trans-

5. *Discusión*

portadores pueden servir como proteínas esenciales, permitiendo al mejillón sobrevivir y reproducirse con éxito en ambientes contaminados.

En los seres humanos, la P-glucoproteína (MDR1) actúa de tres maneras (Fromm, 2004): en primer lugar, regula la absorción del fármaco (xenobiótico) en la membrana luminal de las células de absorción intestinales. Si el medicamento llega a la circulación sanguínea, la eliminación del fármaco es llevada a cabo en la membrana canalicular de los hepatocitos del hígado. Finalmente, la P-gp limita la penetración del fármaco en los tejidos sensibles, como podrían ser el cerebro, los testículos o el feto.

También se observó que la MDR es expresada en muchos tejidos que poseen una función excretora (intestino delgado, hígado y riñón) y en las barreras sangre-tejido: barrera hematoencefálica, barrera sangre-testículo y placenta (Fromm, 2004). Algo similar, traducido a la fisiología de los bivalvos, podría tener lugar en los mejillones, donde también se describe su actividad como una primera línea de defensa contra las moléculas orgánicas moderadamente hidrófobas (Cornwall *et al.*, 1995). Al igual que ocurre en humanos, los mecanismos de transporte de xenobióticos muestran características similares de sustratos sobre los que actúan. Los parecidos que se observan entre estas proteínas en distintas especies podrían mostrar como se ha ejercido una presión evolutiva a lo largo del tiempo, para conservar las propiedades funcionales.

Numerosos trabajos, donde se usaron sustratos fluorescentes, detección inmunológica con anticuerpos monoclonales específicos, y experimentos más recientes con técnicas moleculares han confirmado la actividad de transporte de estas proteínas y su protección contra los contaminantes, en moluscos bivalvos (Minier *et al.*, 1993; Cornwall, 1995; Galgani, 1996; Minier & Moore, 1996 a & b; Smital *et al.*, 2000, 2003; Achard *et al.*, 2004; Hennessy & Spiers, 2007). Actualmente, se están realizando diversos estudios para tener un mejor conocimiento de la expresión de los transportadores, sus funciones en la regulación y las características de los sustratos transportados.

5. Discusión

Una interesante observación respecto a las investigaciones realizadas se refiere a los resultados obtenidos con el anticuerpo monoclonal C219 (Georges *et al.*, 1990), empleado en numerosas investigaciones para confirmar la presencia de P-gp en los tejidos. Se calculó el peso molecular de la proteína, usando la técnica de *western blot*, donde los resultados obtenidos presentan una amplia gama de valores, que difieren entre ellos, según la sensibilidad de la técnica empleada y la especie analizada. En seres humanos, se confirmó la presencia de una molécula glucosilada de unos 140-170 kDa, responsable de esta actividad. En las branquias de *M. galloprovincialis*, se observaron dos bandas inmunorreactivas de 225 y 240 kDa (Galgani *et al.*, 1996). Además, una proteína de 145 kDa fue hallada en *M. californianus* (Cornwall *et al.*, 1995); también se detectó una banda de 170 kDa en esta misma especie (Eufemia & Epel 2000). Otros autores confirmaron una banda de 135 kDa en las branquias de la almeja *C. fluminea* (Waldmann *et al.*, 1995; Achard *et al.*, 2004) y de 200 kDa en las branquias de las ostras *C. gigas* y *C. virginica* (Minier *et al.*, 1993; Keppler & Ringwood, 2001).

Esta amplia gama de resultados puede ser tan variable por distintos motivos, como diferencias en la especificidad por el sustrato, debido a una reacción cruzada con proteínas similares o, incluso, dependiendo del estado de glucosilación de la proteína (Kartner *et al.*, 1985). En este estudio, se calculó el peso molecular de ambas proteínas (sin glucosilar), usando el programa en línea Protein molecular weight (<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>), basado en análisis de las secuencias aminoacídicas completas. Los valores obtenidos fueron 143,91 kDa para MDR1 y 150,37 kDa para MDR2, resultados próximos entre ellos y en el rango de los resultados obtenidos por los demás autores.

Otra interesante investigación, realizada por Kingtong *et al.* (2007) en la ostra *Saccostrea forskali*, confirma la presencia de la proteína MDR1, en los mismos tejidos que se usaron para este trabajo. Se utilizó la técnica de *immunoblotting*, la cual sirve para mostrar la localización de la proteína, que en este caso se localizó en la zona apical del epitelio de las branquias y de la glándula digestiva; mientras que, en el manto, se observó principalmente en la zona citoplasmáti-

5. Discusión

ca de las células basales. En otra especie de ostra (*C. virginica*), los estudios han demostrado la presencia de P-gp en extractos de células (Minier *et al.*, 1993; Keppler & Ringwood, 2001), confirmando también que la MDR de las membranas celulares expulsa sustratos al exterior. Esto se comprobó gracias a la disminución en las tasas de flujo de salida, cuando hay presencia de inhibidores MXR, del colorante rodamina B, en las branquias de las ostras (Ivanina & Sokolova, 2008).

Relacionados con el mejillón, se realizaron numerosos trabajos para confirmar la actividad de la proteína P-gp en las branquias (Kurelec & Pivcevic 1989; Kurelec 1992, 1995b; Cornwall 1995; Smital *et al.*, 2003). Recientemente, Luckenbach & Epel (2008) han realizado un estudio detallado, donde analizaron las secuencias de cDNA de dos proteínas ABC. Se estudiaron su función de transporte en las branquias, usando inhibidores farmacológicos; su expresión génica y la localización de estas bombas transportadoras. Se encontró que la expresión de ABCB, en la interfase branquias-medio ambiente, actúa como una barrera selectiva que dificulta la entrada de los xenobióticos en el organismo. Además, se confirmó la eliminación de productos metabólicos endógenos finales.

Estos procesos de importación y exportación crean una permeabilidad muy selectiva del tejido branquial, permitiendo simultáneamente la acumulación de productos importantes y la expulsión de compuestos perjudiciales. La superficie de contacto branquia-medio ambiente, en el mejillón, puede ser considerado estructuralmente comparable a las barreras sangre-tejido de los vertebrados, controlando la admisión de nutrientes, pero impidiendo la entrada de los xenobióticos mediante los transportadores ABC. Los resultados obtenidos en este estudio, sobre la expresión, también muestran una alta actividad de estas proteínas en las branquias frente a otros tejidos como la glándula digestiva o manto, pudiéndose confirmar la gran importancia de las branquias como una barrera externa entre el medio ambiente y el organismo.

Por tanto, en el presente estudio, se ha demostrado la existencia de dos transportadores transmembrana MDR en *Mytilus galloprovincialis* a nivel de mRNA,

5. Discusión

mediante el uso de diversos cebadores y numerosas reacciones de PCR y RACE PCR, que permitieron obtener la secuencia completa de las dos MDR. Al ser comparadas con las secuencias generales presentes en las bases de datos, se confirma una similitud en ambos casos con genes homólogos *mdr*, pero, al realizar un alineamiento múltiple entre ambas secuencias (*mdr1* y *mdr2*) con el programa ClustalW, se observaron ciertas diferencias, lo que sugiere la posibilidad de que estemos en presencia de dos secuencias parálogas. Esto parece ocurrir también en otras especies de moluscos marinos (*Crassostrea gigas* y *Lotia gigantea*), en los que también se han encontrado, al menos, dos proteínas MDR.

Al analizar el árbol filogenético (Figura 43), se puede observar cómo se forman dos grupos diferentes donde son englobadas cada una de ellas, por separado. Por tanto, nuestra secuencia *mdr1* se agrupa con las secuencias homólogas de *C. gigas* y *L. gigantea* y con la secuencia descrita para la P-gp en el mejillón *M. californianus*, la del erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus* y del gusano hemicordado *Saccoglossus kowalevskii*. Por otra parte, *mdr2* también está comprendida en otro grupo con sus homólogos en *C. gigas* y *L. gigantea*, y con la del mejillón *Brachidontes pharaonis*. El árbol también nos permite observar que hay una secuencia de una MDR en *Crassostrea ariakensis*, que no se agrupa con ninguna otra secuencia. Esto nos hace suponer que probablemente exista, por lo menos, otra proteína MDR en los moluscos bivalvos.

Un estudio adicional, donde se analizó la expresión de estos genes entre tres tejidos diferentes (glándula digestiva, branquia y manto) y en una situación con presencia de OA, mostró que había diferencias entre los dos genes. Esto nos indica que la expresión de estas dos proteínas se regula de forma independiente. Esta situación, donde coexisten dos P-glicoproteínas homólogas, se ha observado en diferentes especies, confirmando distintas actividades y localización, dependiendo del tejido donde fueron analizadas.

Un ejemplo ocurre en roedores, donde se han descrito varias MDR y, dentro de la MDR1, se han caracterizado dos diferentes (ABCB1a y ABCB1b, codificadas por los genes *mdr1a* y *mdr1b*, respectivamente). Al estudiar la expresión de

5. Discusión

los genes en los distintos tejidos, se observa como varían considerablemente. Así, la *mdr1a* se expresa a niveles elevados en la barrera hematoencefálica, intestino, placenta, hígado y riñón, mientras que *mdr1b* se sobreexpresa en la glándula adrenal, el endometrio del útero gestante, ovario, placenta, hígado, y riñón (Leslie *et al.*, 2005). En esta investigación, se ha observado que en el mejillón, ocurre algo similar, observándose diferentes niveles de expresión según el tejido analizado.

5.2. Análisis de genes de referencia

La distribución y la expresión de estas proteínas en los órganos de mejillones como branquias, manto y glándula digestiva, fue medida por RT-qPCR, ya que permite investigar este importante mecanismo en invertebrados acuáticos, a nivel transcripcional de los genes. La RT-qPCR es una técnica, que se utiliza habitualmente, para la cuantificación de la expresión génica, debido a su alta sensibilidad y robustez.

En primer lugar, varios genes de referencia fueron evaluados para encontrar los más estables y usarlos como normalizadores, ya que utilizar genes de referencia inestables puede producir resultados incorrectos y conducir a conclusiones erróneas. Realizar una normalización precisa de los niveles de expresión de los genes es una condición sin la que no se podrían obtener resultados fiables. Además, muchos estudios han demostrado que el uso de un único gen de referencia no es apropiado para la normalización en la cuantificación de la expresión génica y que emplear un conjunto de varios genes de referencia es más adecuado para este propósito (Vandensompele *et al.*, 2002).

Desafortunadamente, no hay establecido un grupo de genes estables universales de referencia, ya que son variables, según como se expresen en los diferentes tejidos y las distintas condiciones biológicas y ambientales que se den para cada análisis. Además, es difícil reconocer genes válidos para utilizar en la normalización, sin llevar a cabo un estudio que los identifique. Esto justifica la búsqueda de genes que presenten una expresión estable, en cada situación

5. Discusión

experimental, para el desarrollo de una estrategia de normalización adecuada.

Los genes candidatos para realizar ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real fueron evaluados en mejillones, condicionados por la presencia de una floración de plancton tóxico. También se realizó este análisis con el fin de comparar los genes más estables para los tres tejidos. La selección de los ocho genes candidatos –NADH deshidrogenasa subunidad 4 (*nd4*); gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*); citocromo c oxidasa subunidad I (*cox1*); proteína de fusión ubiquitina - proteína ribosomal S27 (*rps27*); factor de iniciación de la traducción 5A (*tif5a*); 40S proteína ribosomal S4 (*rps4*); actina (*act*) y RNA ribosomal 18S (*18S*)– estuvo basada, principalmente, en genes de referencia conocidos y empleados para otros organismos. Los genes de referencia ideales deberían mostrar un patrón regular y estable, con independencia de cómo influyen los factores que rodeen al organismo de estudio, por lo que no deberían participar en las rutas que podrían ser activadas durante la situación experimental, ya que, probablemente, serían genes inestables.

Algunos de los algoritmos normalmente empleados para la evaluación de los genes de referencia son altamente dependientes de que su expresión no sea co-regulada bajo condiciones experimentales. Por esto, los ocho genes que se han seleccionado representan diferentes clases funcionales y están involucrados en diferentes procesos biológicos (Tabla 5), por lo que el efecto de tal co-regulación, en teoría, debería ser menor.

Puesto que los genes de referencia deberían ser estables, durante todo el experimento en el que se estudia la expresión de los genes diana, la toma de muestras para la evaluación de los genes de referencia debe ser cuidadosa. Por lo tanto, para este estudio, han sido muestreados mejillones libres de toxinas y mejillones en presencia de ácido okadaico, en cuatro momentos diferentes a lo largo de la curva de intoxicación-desintoxicación. Se analizaron noventa y tres muestras para cada tejido. Los valores de Cq obtenidos muestran que los genes candidatos son bastante estables en todas las condiciones expe-

5. Discusión

rimentales, a excepción de *nd4* en la glándula digestiva, tanto en los mejillones libres de toxinas como en aquellos con presencia de toxina.

NormFinder, geNorm y BestKeeper son programas que se utilizan comúnmente para determinar los genes de referencia más estables, a partir de un grupo de candidatos. Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas e inconvenientes. En geNorm, la estabilidad de un gen candidato se determina por comparación por pares de la variación de los coeficientes de expresión, por lo que la estabilidad de un gen de referencia dependerá de la serie de genes candidatos que se incluyen en el análisis. En vez de localizar el gen expresado más estable, el geNorm tiende a seleccionar el gen que presenta mayor grado de similitud con el patrón de expresión de genes candidatos, basándose en el conjunto de datos.

El algoritmo BestKeeper utiliza un valor o índice BestKeeper, que es la media geométrica del Cq de los genes candidatos. Un buen gen candidato debe presentar una buena correlación (lo más próximo a 1), mientras que valores elevados en la desviación estándar indican que los genes son inestables. El software NormFinder determina la estabilidad de los genes candidatos, basándose en una estimación de la variación inter e intra-grupo.

Los genes que elegimos se han utilizado en muchos estudios como genes de referencia para normalizar los resultados. Pero, como se ha demostrado tras numerosas investigaciones, la mayoría de los genes usados, sin una previa validación, no son adecuados como genes de referencia. Por ello, algunos trabajos deberían ser revisados y se debería analizar la estabilidad de esos genes, antes de ser utilizados como normalizadores.

El gen *gapdh* se utiliza con frecuencia como un gen de referencia, debido a su papel clave en la ruta glucolítica. Sin embargo, *gapdh* se asocia con varias funciones, como la fusión de la membrana en la exocitosis, la exportación del RNA nuclear, la replicación y reparación del DNA, la apoptosis o frente a patogénesis viral (Bustin, 2002; Hugget *et al.*, 2005). Los niveles de mRNA de la *gapdh* pueden ser regulados en situaciones comunes y, en algunos casos, po-

5. Discusión

dría ser apropiado como gen de referencia para algunas condiciones experimentales.

Nuestros datos de expresión para la *gapdh* confirmaron este gen como un buen estándar interno para el estudio de la expresión génica en mejillones en presencia de mareas tóxicas. Se obtuvieron resultados similares con la *gapdh* en el delfín rayado *Stenella coeruleoalba* (Spisanti *et al.*, 2006), en el lenguado japonés *Paralichthys olivaceus* (Aoki *et al.*, 2000) y, más recientemente, fue validado como un gen de referencia adecuado para la ostra plana *Ostrea edulis* (Morga *et al.*, 2010) y, para la gónada masculina, en la vieira *Pecten maximus* (Mauriz *et al.*, 2012).

rps4 y *rps27* codifican proteínas de la subunidad ribosómica pequeña y son componentes estructurales de esta región ribosomal. Aunque los genes que codifican proteínas ribosomales se han recomendado previamente para su uso, principalmente, en métodos de detección menos sensibles, como la *Northern blot* (Thellin *et al.*, 1999), muchos estudios recientes de validación de genes de referencia han confirmado que los genes codificantes para las proteínas ribosomales muestran estabilidades considerables en la expresión de diferentes líneas celulares y tejidos de mamíferos (Brinkhof *et al.*, 2006; Spisanti *et al.*, 2006; Janovick-Guretzky *et al.*, 2007), peces (Infante *et al.*, 2008), moluscos (Siah *et al.*, 2008; Mauriz *et al.*, 2012) o plantas (Barsalobres-Cavallari *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos en este estudio también sugieren que los genes que codifican para las proteínas ribosomales pueden ser buenos candidatos para sustituir genes de referencia tradicionales como controles internos en los ensayos de PCR a tiempo real.

cox1 (citocromo c oxidasa subunidad 1) es un gen mitocondrial que codifica para un componente de la cadena respiratoria mitocondrial del complejo IV. Este gen es uno de los marcadores más populares, empleado en genética de poblaciones y estudios filogenéticos, en todo el reino animal. Los resultados obtenidos en la glándula digestiva y las branquias de *M. galloprovincialis* consideraron a *cox1* como un gen estable para esta situación.

5. Discusión

Los resultados también sugieren que el *18S*, *nd4* y *act*, de uso muy frecuente como genes para la normalización, han de ser empleados con precaución como gen de referencia en estudios de RT-qPCR, ya que aparecen como los genes menos estables en los tres tejidos analizados. Los genes *18S* y *act* se han evaluado en otros estudios en moluscos (Siah *et al.*, 2008; Araya *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2011; Morga *et al.*, 2011), para utilizarlos como normalizadores en análisis de expresión, pero también se encontró que, por lo general, son genes inestables y, por lo tanto, no recomendables para usarlos como genes de referencia.

El gen *18S* rRNA se ha empleado, habitualmente, como un gen de control interno para la RT-qPCR, en numerosos estudios de expresión e incluso en trabajos en mejillones (Franzelliti & Fabri, 2006; Dondero *et al.*, 2005; Puinean *et al.*, 2006). Pero, debido a su abundancia, cuando se compara con el mRNA, se convierte en inadecuado para la normalización (Vandesompele *et al.*, 2002). Se han realizado numerosos estudios, donde se evalúan las variaciones de nivel de rRNA, para poder usarlo como normalizador (Hansen *et al.*, 2001; Tricarico *et al.*, 2002; Araya *et al.*, 2008; Siah *et al.*, 2008; Sellars *et al.*, 2007; Olsvic *et al.*, 2005), confirmando que el *18S* era un gen bastante inestable.

La *act* es el gen que codifica para la proteína presente en mayor abundancia en células eucariotas. Es un componente importante, implicado en la estructura del citoesqueleto, que soporta la célula y determina su forma, jugando un papel esencial en la fagocitosis y la encapsulación. Con frecuencia, los genes que codifican para las actinas se han empleado como genes de referencia en numerosos estudios de expresión de RT-qPCR en moluscos (Dondero *et al.*, 2005; Cellura *et al.*, 2006; Banni *et al.*, 2007). Varios trabajos han demostrado que la *act* actúa como un control interno inapropiado para análisis de RT-qPCR (Selvey *et al.*, 2001; Deindl *et al.*, 2002; Hugget *et al.*, 2005; Zhang & Hu, 2007). Los resultados obtenidos en esta investigación también sugieren que la expresión de *act* se ve afectada por la presencia de ácido okadaico y es, por lo tanto, un gen inestable.

5. Discusión

Es difícil comparar nuestros resultados en moluscos con otros estudios, ya que hay una falta de investigaciones sobre la selección de genes de referencia en estos organismos (Wan *et al.*, 2011). Hasta la fecha, se conocen pocos informes sobre la evaluación de estos genes en bivalvos (Araya *et al.*, 2008; Siah *et al.*, 2008; Morga *et al.*, 2010; Dheilily *et al.*, 2011; Cubero-León *et al.*, 2012, Mauriz *et al.*, 2012) y, además, la mayoría de ellos están dirigidos a los hemocitos (Araya *et al.*, 2008; Siah *et al.*, 2008; Morga *et al.*, 2010). En el ostra japonesa *Crassostrea gigas* (Dheilily *et al.*, 2011), los genes más estables eran *gapdh* y el *adp factor de ribosilación 1*. *gapdh* también se encontró bien clasificado en la ostra plana *O. edulis*.

Varios autores (Araya *et al.*, 2008; Siah *et al.*, 2008; Morga *et al.*, 2010) evaluaron los diferentes genes de control en dos situaciones para la almeja (*Mya arenaria*) y encontraron que *ef1* (factor de elongación 1) y *S-18* (proteína ribosómica) fueron los genes más estables. En el abalón *Haliotis discus*, *rpl5* (proteína ribosomal L5), *elf* (factor de elongación 1) y *sdha* (succinato deshidrogenasa) se consideraron los genes más estables (Wan *et al.*, 2011). En la vieira *P. maximus*, Mauriz *et al.* (2012) encontraron que los genes más estables, a lo largo del ciclo gametogénico, fueron *ndufa7*, *rpsa* y *ef1a* en ovario, mientras que para la gónada masculina fueron *18S*, *ndufa7* y *gapdh*. Estas observaciones sugieren la posibilidad de que, para distintas especies o en diferentes condiciones experimentales, se requieran diferentes controles internos para la normalización en las RT-qPCR.

El número óptimo de genes de referencia utilizados para la normalización será dependiente de las consideraciones prácticas y la precisión deseada para el experimento. Generalmente, se ha sugerido que el uso de tres genes de referencia es suficiente en la mayoría de los casos (Vandesompele *et al.*, 2002), principalmente cuando solo unos pocos genes diana son los que van a ser estudiados. El programa geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) se puede utilizar para determinar el número óptimo de genes de referencia necesarios para la normalización, mediante los valores obtenidos de la variación por pares ($V_{n/n+1}$), calculada entre los factores de normalización NF_n y NF_{n+1} (utilizando los genes de referencia n o $n+1$, respectivamente).

5. Discusión

Vandesompele *et al.* (2002) han sugerido un corte arbitrario con un valor de 0,15, por debajo del cual la inclusión de más genes de referencia no es necesaria. Muchas veces no se alcanzan valores inferiores, por lo que debe ser el investigador el que sugiera cual es el valor de corte adecuado. Ling & Salvaterra (2011) proponen que el valor mínimo $V_{n/n+1}$ representa el factor de normalización (NF) más estable y, por lo tanto, correspondería al número óptimo de genes de referencia necesarios para la normalización. Según este criterio, serían necesarios cinco genes de referencia en la glándula digestiva y manto, y cuatro o seis en las branquias, porque V5/6 alcanza los valores más bajos en la glándula digestiva y manto, mientras que V6/7 muestra el valor más bajo en las branquias, pero, como en V4/5 hay un valor inferior al que aparece en V5/6, se consideró que con cuatro genes era suficiente (Figura 44). Al comparar los tres tejidos, serían necesarios cinco genes de referencia, porque también es en V5/6 donde se alcanzan los valores más bajos.

La mejor solución para elegir los genes de referencia que vayamos a usar es, probablemente, usar los diferentes algoritmos para evaluar la estabilidad de los genes candidatos y seleccionar aquellos bien clasificados tras todos los análisis. Finalmente, se decidieron utilizar tres genes para cada tejido por separado y cuatro, cuando se querían comparar entre ellos. Esto es debido a que, por un parte, se consideró que tres genes de referencia eran suficientes para llevar a cabo el análisis, tal como propusieron Vandesompele *et al.* (2002). Además, la elección de más genes de referencia planteaba problemas. Esto es debido a que, según los tres programas, los tres genes clasificados como más estables coinciden, pero a partir de la cuarta posición hay discrepancias.

Por ello los genes de referencia que se usaron son:

- Los tres tejidos (glándula digestiva, branquias y manto): *gapdh*, *rps27*, *rps4* y *cox1*.
- Glándula digestiva: *gapdh*, *rps4* y *cox1*.
- Branquia: *gapdh*, *rps4* y *cox1*.
- Manto: *gapdh*, *rps4* y *rps27*.

5. Discusión

5.3. Estudios de expresión de los genes que codifican para las proteínas MDR

Como ya se ha explicado en el apartado 1.1.4. *Biología, anatomía y fisiología del mejillón M. galloprovincialis*, los mejillones son animales suspensívoros, que filtran grandes volúmenes de agua para alimentarse, pudiendo acumular una amplia variedad de contaminantes y toxinas fitoplanctónicas en su cuerpo. Una vez estos compuestos son absorbidos, se almacenan en los diferentes tejidos del animal, dependiendo de su composición bioquímica y la condición fisiológica de cada individuo (Widdows & Donkin, 1992).

El ácido okadaico es una toxina lipofílica producida por algunas microalgas, principalmente por varias especies de los géneros *Prorocentrum* y *Dinophysis* (Yasumoto *et al.*, 1980). La principal forma de captación de este contaminante orgánico en los mejillones es a través de las membranas de las branquias, cuando están filtrando las partículas en suspensión del medio y, sobre todo, mediante el sistema digestivo, cuando las microalgas son asimiladas. Una vez en el cuerpo de los animales, las toxinas pueden ser expulsadas o transportadas y distribuidas a lo largo de diferentes tejidos, según la afinidad que exista entre ellos.

La distribución anatómica de algunas toxinas DSP en mejillones y otros bivalvos ha sido investigada por numerosos autores. La cinética de las toxinas se analizó en diversos órganos y se observaron diferentes capacidades para convertir y expulsar las toxinas (Bricelj & Shumway, 1998; Blanco *et al.*, 2002; 2007b). Se ha demostrado que los compuestos lipófilos como OA tienen afinidad para unirse a regiones lípidicas de los tejidos (Livingstone & Pipe, 1992; Svensson & Förlin, 2004) y, en los mejillones, la glándula digestiva es un órgano muy rico de lípidos. Una gran variedad de estudios han confirmado una acumulación principal de este tipo de toxina en la glándula digestiva (Yasumoto *et al.*, 1978; Murata *et al.*, 1982; Svensson 2003b; Suzuki *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2007b; McCarron *et al.*, 2008).

Suzuki *et al.* (2005) y Blanco (2007b) han demostrado, por diferentes métodos, la presencia de pequeñas trazas de toxinas DSP en los tejidos no viscerales

5. *Discusión*

de bivalvos, pero la principal acumulación de este compuesto se produce en la glándula digestiva y, además, no parece que tenga lugar un transporte a otros tejidos. Asimismo, en un experimento donde las toxinas se inyectaron en el músculo abductor de la vieira *Patinopecten yessoensis*, se observó como estas fueron transportadas rápidamente al hepatopáncreas, demostrando una baja capacidad del músculo aductor para almacenar y metabolizar este tipo de compuestos (Suzuki *et al.*, 2005). El patrón de distribución descrito para las toxinas DSP fue diferente al que se observó para el ácido oxolínico, que se distribuyó uniformemente en todos los tejidos en la vieira (*Pecten albicans*), cuando este fue inyectado en el músculo aductor (Ishida, 1998).

Las branquias, en los mejillones, son responsables de la respiración y la captura de los alimentos. Estructuralmente, son comparables a la barrera hematoencefálica, presente en los vertebrados, y, en este caso, están encargadas de regular la entrada de nutrientes y evitar la entrada de xenobióticos, gracias en parte a los transportadores ABC (Minier, 1999; Bard, 2000). Probablemente por esta razón, este tejido es el más empleado en investigaciones asociadas con contaminantes y sobre la funcionalidad y actividad de estos transportadores de membrana. Estudios anteriores habían confirmado la actividad del mecanismo MXR en branquias de bivalvos, estudiando la respuesta frente a sustratos específicos, bajo la presencia de inhibidores para estos transportadores (Cornwall *et al.*, 1995; Galgani *et al.*, 1996; Smital *et al.*, 2000; Luckenbach & Epel, 2008).

Otro tejido en contacto directo con el medio, pero que no se ha usado normalmente en las investigaciones, es el manto. Se puede considerar como un órgano con cierta función protectora, actuando como una barrera frente al medio, evitando la entrada de sustancias tóxicas. El principal papel del manto es secretar la concha, pero también tiene otros fines; por ejemplo, presenta una función sensorial para el cierre de las valvas en respuesta a condiciones ambientales desfavorables; está encargado de controlar la entrada de agua en la cavidad interna del animal y, además, puede actuar en la actividad respiratoria del individuo (Helm *et al.*, 2004). Asimismo, los lóbulos del manto son in-

5. Discusión

vadidos con el desarrollo gonadal. Por lo tanto, también se puede considerar que en este tejido se lleva a cabo la gametogénesis.

También se han estudiado las células sanguíneas de los mejillones ya que están implicadas en la defensa interna y son muy ricas en lisosomas, sitio habitual para la acumulación de muchos contaminantes. Moore & Willows (1998) propusieron que los lisosomas representan un mecanismo de protección contra los compuestos tóxicos en el mejillón. También, que existe la posibilidad de un transporte MXR intracelular, como un modo de acumulación lisosomal de los contaminantes ambientales. Minier & Moore (1996b) encontraron que las células sanguíneas de *M. edulis* expresan una funcionalidad propia de las proteínas P-gp en las membranas celulares; y Svenson *et al.* (2003b) encontró que el sistema lisosomal de las células sanguíneas, en el mejillón *M. edulis*, puede estar involucrado en la protección contra los efectos nocivos de sustancias tóxicas, tales como OA.

Esta investigación se centró en analizar la expresión de las proteínas de transporte de membrana (MDR/P-gp) en la glándula digestiva, branquias y el manto de mejillón *Mytilus galloprovincialis*, comparando los tres tejidos entre sí, por un lado, y a lo largo de una exposición tóxica natural de ácido okadaico, mediante la técnica analítica de RT-qPCR. La glándula digestiva está considerada como el órgano encargado de metabolizar y expulsar los compuestos tóxicos fuera del cuerpo, mientras que las branquias y el manto están probablemente implicados en el control de la entrada de numerosos compuestos, por lo que se pueden considerar tejidos barrera.

Conocer la expresión de las proteínas transportadoras ABCB podría ser revelador de la función que muestran estos tejidos frente a una contaminación natural, ya que el aumento de expresión de genes protectores, como son aquellos que codifican para las proteínas de resistencia frente a multixenobióticos, es considerado como un importante mecanismo de defensa (Epel *et al.*, 2008). Existen numerosas investigaciones que han confirmado una estimulación en la actividad de transporte, relacionada con resistencia a multixenobió-

5. Discusión

ticos y un aumento de los niveles de expresión de las proteínas ABC, en situaciones de toxicidad.

La mayor evidencia sobre el papel de estos transportadores, en la resistencia frente a la toxina, proviene de estudios en ratones *knockout* con genes bloqueados. También se ha confirmado esta actividad estudiando la inhibición del transporte, midiendo la capacidad que presentan las células para expulsar sustratos fluorescentes de las proteínas MDR. Se considera como una técnica relativamente simple para la determinación de la actividad de MXR y se calcula como la relación de sustrato acumulado en una célula, en ausencia y en presencia de inhibidores, lo que proporciona una medida de la actividad de transporte (Neyfakh, 1988).

Otro procedimiento habitualmente empleado para observar la presencia de estas proteínas es la immuno-reactividad con anticuerpos de mamíferos anti-P-gp. El anticuerpo monoclonal C219 reconoce una secuencia altamente conservada de aminoácidos frecuente en todas las P-glicoproteína (Georges *et al.*, 1990). Se ha de tener cuidado con este método, ya que la presencia de falsos positivos, por reacciones cruzadas con proteínas similares, es posible.

Últimamente, las técnicas moleculares como estudios de PCR, RT-qPCR, *microarrays*, geles bidimensionales de proteínas, hibridación *in situ*, *western blot* se están utilizando para realizar los estudios de expresión y para comprobar la localización de las proteínas.

Por tanto, además de conocer los posibles tejidos que controlan la entrada y la posterior eliminación de los tóxicos, también sería importante saber cómo actúan los transportadores de membrana para regular el paso de dichos compuestos. Se ha observado que los transportadores, principalmente de la subfamilia ABCB, actúan como una primera línea de defensa contra las sustancias tóxicas, impidiendo, en primer lugar, su entrada en las células y, finalmente, como una última defensa, mediante la expulsión de los tóxicos (Figura 16). Estos transportadores ABC de múltiples fármacos juegan un papel importante en el establecimiento de las barreras biológicas, tal como ocurre en la placen-

5. *Discusión*

ta, la barrera hematoencefálica, o la barrera de sangre-testículo en mamíferos (Fromm, 2004; Leslie *et al.*, 2005).

La acción barrera de estos transportadores contra los tóxicos puede ser inhibida o disminuida, cuando la concentración máxima del sustrato excede la capacidad del transportador; o por la presencia de otros compuestos que compiten por los sitios de unión al sustrato (Higgins, 2007). Es entonces cuando los xenobióticos entran en las células, donde serán sometidos a una transformación enzimática, o serán expulsadas directamente al exterior.

Esta modificación se inicia con una oxidación por el sistema P450 (fase I), seguido de la conjugación del xenobiótico, que será unido a pequeñas moléculas polares tales como glucosa, sulfato o glutatión (reacciones de fase II). Finalmente, los compuestos conjugados como el glutatión, glucuronato o aniones orgánicos sulfato-conjugados (Cole & Deeley, 1998) pueden ser eliminados, en la fase III, por algunos transportadores ABCC y ABCG hacia el exterior de la célula (Deeley *et al.*, 2006; Epel *et al.*, 2008). Estas sustancias tóxicas modificadas no son reconocidas generalmente como sustratos de los transportadores de tipo ABCB (Cole & Deeley, 1998). Luckenbach & Epel (2008) observaron, en las branquias de bivalvos, una inducción de la expresión de las proteínas ABCB y ABCC para un amplio espectro de compuestos, que pueden ser eliminados directamente o transportados en forma de metabolitos.

Estas proteínas (MDR/P-gp) muestran una especificidad muy amplia por el sustrato, con una tendencia hacia los compuestos lipofílicos y catiónicos. Chan *et al.* (2004), en tejidos de excreción humanos, observó una regulación coordinada de la P-gp con las enzimas del metabolismo de la fase I y fase II, como la familia del citocromo P450 o la glutatión-S-transferasa. Además, la MDR3 (ABCB4) transporta fosfolípidos y un gran número de fármacos citotóxicos. Chan *et al.* (2004) también analizó las proteínas MRP en tejidos humanos: la localización basolateral de MRP1 en tejidos normales sugiere una protección de las células por expulsión de los sustratos a la sangre; MRP2 exporta compuestos conjugados electrófilos obtenidos en la fase II; y MRP3 parece ser

5. Discusión

un mecanismo de protección secundario, que se activa cuando las funciones excretoras normales se ven comprometidas.

Otras investigaciones, realizadas en distintos tejidos de diversos mamíferos, mostraron la presencia de MDR1 en el borde apical de una variedad de epitelios secretores, tales como los túbulos renales proximales, tractos gastrointestinales y hepatocitos biliares (Sarkadi *et al.*, 2006), mientras que la MRP1 se expresa de forma ubicua (Leslie *et al.*, 2005). Algo similar fue trasladado a bivalvos por Kingtong *et al.* (2007), quienes han investigado la localización celular y la expresión de estos transportadores en tejidos de la ostra (branquias, manto y glándula digestiva), usando una tinción con anticuerpos para observar inmunorreactividad positiva. Se encontró la MDR1 en las células apicales situadas en la superficie de las branquias, en el compartimiento citoplásmico de las células del manto y en la superficie apical de lumen digestivo de la glándula digestiva. Por su parte, la MRP1 se expresaba en todos los tejidos, principalmente en las células basales del manto y de la glándula digestiva, así como en la superficie y ejes de las branquias.

En el presente estudio, se analizó la expresión del cDNA que codifica para los transportadores ABC de múltirresistencia a fármacos (MDR) en el mejillón *M. galloprovincialis*. Los resultados de la RT-qPCR (Figura 49, Tabla 17, Tabla 19, Tabla 20 y Tabla 22) mostraron que la exposición al ácido okadaico y derivados, causada por la microalga *Dinophysis acuminata*, indujo la expresión, en algunas situaciones, para determinados genes *mdr* en glándula digestiva y en branquias, pero no en el manto.

Los resultados indican la presencia de los transportadores estudiados en los tres tejidos, pero no se observa ninguna sobreexpresión de este tipo de proteínas para el manto, ante la presencia de toxina. Esto sugiere que este tejido no presenta un papel protector importante en la eliminación de las toxinas de este tipo. Como se ha mencionado, el manto es invadido principalmente por el tejido gonadal, presentando probablemente una función reproductora, y, al no haber un contacto directo con las toxinas, la protección frente a ellas quedaría en segundo plano. Además, tampoco tiene un contacto directo con el

5. Discusión

alimento ingerido, que sería la fuente directa de ácido okadaico. Por lo tanto, no se acumulan toxinas y no hay inducción de la expresión de estas proteínas.

Con los datos obtenidos, también es posible observar como en las branquias se produce una inducción de la expresión de ambos genes (*mdr1* y *mdr2*) cuando hay presencia de ácido okadaico en el medio. Algo similar ocurre para la glándula digestiva, mostrando una mayor expresión de la *mdr1*, cuando hay toxina DSP. Cabe destacar que los valores más significativos (nivel de significación más próximo a 0), para ambos genes, son cuando se compara el control frente a Bueu 3, que es el muestreo donde se alcanzaron los valores más elevados de concentración de ácido okadaico. Estos resultados nos hacen pensar que, en presencia de altas concentraciones de esta toxina, tanto en el medio como ya asimilado por el individuo, se produce una respuesta directa de activación de los procesos de multirresistencia a xenobióticos (MXR). Y ambos tejidos presentan sus funciones, tanto de desintoxicación en la glándula digestiva como de barrera frente a los tóxicos, en las branquias, completamente activadas, para proteger el organismo.

Se debe recordar que estas proteínas desempeñan una función protectora, impidiendo la entrada de diversos compuestos y que también actúan expulsando compuestos tóxicos, antes de ser modificados, a diferencia de las proteínas MRP, que actúan sobre las sustancias una vez transformadas. Además, es interesante destacar que la sobreexpresión de *mdr2* se produce solo en la branquia, lo que podría indicar que este tejido tenga una mayor función protectora como barrera. De todas formas, se deberían realizar más estudios para evaluar la actividad de estas proteínas en los diferentes tejidos.

En nuestro laboratorio, se llevó a cabo un estudio paralelo, con el fin de analizar como variaba la expresión de otros dos genes que codifican para proteínas de la familia MRP/ABCC, en las mismas condiciones (a lo largo de un episodio tóxico de DSP). Como se mencionó previamente (apartado 1.3.3.2. *Mecanismos de metabolización*), las proteínas MRP están implicadas en el transporte de los metabolitos una vez conjugados. Los resultados que se obtuvieron para estos genes podrían confirmar esta idea, ya que cuando se comparó la expre-

5. Discusión

sión de los dos genes (*mrp1* y *mrp2*) entre los tres tejidos, se observó que ambos se expresaban más en la glándula digestiva.

Se ha comprobado que este tejido acumula grandes concentraciones de ácido okadaico, donde se metaboliza para su posterior expulsión. Por tanto, el mayor nivel de expresión de los genes *mrp* en la glándula digestiva concuerda con la actividad que tiene lugar en este tejido. Además, cuando se analizó la expresión a lo largo del ciclo de intoxicación, también se observó como el gen *mrp2* se sobreexpresaba en la glándula digestiva en presencia de ácido okadaico, pero no en la branquia.

En conclusión, los resultados de este estudio demostraron que al menos dos importantes proteínas ABCB están presentes en el mejillón (*Mytilus galloprovincialis*). Además, se ha confirmado la inducción de su expresión, ante la presencia prolongada de toxinas naturales en el medio. Aun así, se deberían realizar trabajos adicionales, con el fin de procurar comprender la compleja función de estas proteínas, cómo se regulan y las especificidades que existen por los distintos sustratos, que pueden modificar su actividad, así como profundizar en cómo actúan los mecanismos de resistencia a multixenobióticos en invertebrados marinos.

Se ha de recordar que el sistema MXR presente en bivalvos marinos fue estudiado por algunos autores y la inducción de este sistema frente a una amplia gama de contaminantes se demostró, utilizando diferentes técnicas para confirmarla (Minier *et al.*, 1993; Waldman *et al.*, 1995; Galgani *et al.*, 1996; Bard, 2000; McFaden *et al.*, 2000; Smital *et al.*, 2000; Eufemia *et al.*, 2002; Achard *et al.*, 2004; Franco *et al.*, 2006; Franzelliti & Fabbri, 2006; Kington, 2007; Ivanina & Sokolova, 2008; Buratti *et al.*, 2011; Navarro *et al.*, 2012). Los datos obtenidos en estas investigaciones indican que algunos transportadores ABC, en organismos acuáticos, dan protección a los individuos frente a la presencia de compuestos tóxicos y los factores de estrés.

Son numerosos los trabajos dedicados a estudiar como varía la expresión de estas proteínas en invertebrados marinos, ante la presencia de diferentes con-

5. Discusión

taminantes. Minier *et al.* (2006) realizaron un estudio con mejillones (*Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis*) y la ostra (*Crassostrea gigas*), en el que se utilizó el anticuerpo monoclonal C219 para evaluar los niveles de expresión de MXR. Los resultados indicaron una fuerte asociación entre las cantidades contaminantes, que estaban directamente relacionadas con la concentración de proteínas MXR.

En otra investigación llevada a cabo por Franco *et al.* (2006) se observó como las branquias del mejillón *Perna perna*, expuestas a zinc, indicaban una activación del mecanismo de transporte encargado de desintoxicar subproductos resultantes de metabolismos oxidativos. Ya se había obtenido un resultado similar en el experimento realizado por Bard (2000) en *Mytilus galloprovincialis* frente a la exposición de xenobióticos.

Existe también algún estudio que analizó si el cadmio (Cd) inducía niveles elevados en la expresión de los transportadores P-gp. Ivanina & Solokova (2008) encontraron un fuerte aumento en la actividad de transporte de sustratos, cuando la ostra *Crassostrea virginica* estaba expuesta al Cd, mientras que Achard *et al.* (2004) observaron que sí existía inducción en la almeja de agua dulce *Corbicula fluminea*. Estos investigadores también evaluaron la exposición frente a cobre, encontrando un aumento de la expresión de la P-gp. Franzellitti & Fabbri (2006) llevaron a cabo un experimento para observar la respuesta MXR contra dos formas químicas diferentes de mercurio en la glándula digestiva de mejillón y observaron que los genes fueron sobreexpresados temporalmente, hasta pasadas las 8 horas de exposición, pero tras períodos más largos se produjo una subexpresión. Sugirieron que tanto el mercurio orgánico como el inorgánico inducen la expresión del sistema MXR, que los elimina de las células.

Navarro *et al.* (2012) también observaron mayor presencia de transcritos del gen *abcb1* en *Dreissena polymorpha*, que aumentó debido a la presencia de mercurio y del herbicida dacthal. Este último compuesto, de igual forma, fue empleado en otra investigación realizada por Tutundjian & Minier (2007), donde vieron como inducía la expresión de *abcb1* en *D. polymorpha*. Kingtong *et al.*

5. *Discusión*

(2007) estudiaron la expresión de estos transportadores en las ostras con elevadas concentración de tributilestaño (TBT) y los resultados mostraron una subexpresión en branquias y manto, que podría ser debida a los efectos tóxicos del TBT en estos tejidos, provocando una disminución general de la síntesis de proteínas.

Recientemente, Manfrin *et al.* (2010) utilizaron un microarray de cDNA de mejillón *M. galloprovincialis* para evaluar los cambios de expresión génica en la glándula digestiva, bajo la presencia de ácido okadaico. Utilizaron este tejido porque, en los bivalvos, las toxinas DSP son principalmente acumuladas en esta región, ya que las células digestivas del hepatopáncreas son ricas en lisosomas, que tienen alta afinidad por xenobióticos lipofílicos.

Después del experimento, los resultados obtenidos confirman dos fases distintas en presencia de ácido okadaico. Primero, se presenta una inducción de numerosos genes, sugiriendo una activación de los mecanismos de defensa, y, a continuación, hay otra fase en la que se aumenta el número de genes infra-expresados, reflejando una caída de muchos procesos celulares, probablemente causado por la acumulación y presencia de la toxina. También se confirmaron las numerosas rutas que son activadas o inhibidas cuando hay presencia de ácido okadaico en el medio. Podría ser interesante completar este microarray con las numerosas proteínas ABC encontradas durante los últimos años y así poder observar su comportamiento. La expresión de la proteína (MDR en este caso) puede estar influenciada en presencia de toxinas, debido a la activación o inhibición de las diferentes rutas de síntesis.

Como se observa en este tipo de estudios, se puede confirmar que la expresión de las proteínas transportadoras ABC se induce generalmente bajo la presencia de una amplia variedad de contaminantes.

Además, se han realizado numerosos estudios cuyo objetivo era conocer bien como afectan los distintos factores que pueden inducir a situaciones de estrés en los mejillones y cómo influyen en la depuración de toxinas en los organismos.

5. Discusión

La relación de la temperatura y la tasa de actividad de los sistemas MXR se está estudiando en bivalvos desde hace unos años. Se supone que la temperatura es un factor de regulación de las tasas de depuración de toxinas en los mejillones, debido a su efecto general sobre las tasas metabólicas basales en organismos poiquiloterms.

En algunas investigaciones, se comprobó como la tasa de filtración y el consumo de oxígeno se reducen en el mejillón cebra *Dreissena polymorpha*, al elevar la temperatura, lo que podría inducir a un aumento de la concentración de xenobióticos (Fisher *et al.*, 1993; Gossiaux *et al.*, 1996). En otras investigaciones, se demuestra que la expresión de la P-glucoproteína en distintos moluscos –*Mytilus edulis* (Minier *et al.*, 1999), *Mytilus galloprovincialis* (Minier *et al.*, 2000) y *Crassostrea virginica* (Keppler & Ringwood, 2001)– es dependiente de la estación y la temperatura, observándose las mayores expresiones durante los meses más calurosos.

Los niveles bajos de la expresión y actividad de las proteínas responsables del proceso MXR podrían estar relacionados con las temperaturas bajas, debido a una consecuente baja actividad metabólica de los bivalvos. Además, se observó que el incremento de la actividad, al aumentar la temperatura, contribuía a la inducción del sistema MXR (Pain & Parant, 2003a). También se confirmó, en estudios de campo, como un aumento o disminución de 5°C estaba asociado con variaciones significativas en el nivel de proteína MXR en el mejillón cebra *D. polymorpha* (Minier *et al.*, 2006) y el mejillón mediterráneo *M. galloprovincialis* (Minier *et al.*, 2000).

Tutundjian & Minier (2007) analizaron si la actividad y los niveles de estas proteínas variaban cuando los mejillones cebra *D. polymorpha* se aclimataban lentamente a temperaturas que variaban desde 4 hasta 20°C, pero no observaron cambios significativos en la expresión de la dichas proteínas. Los valores se mantuvieron en el rango de los registrados al final de la fase de aclimatación, incluso después de 7 días, a las nuevas temperaturas. Un tiempo de incubación de 7 días sería suficiente para inducir al sistema MXR, con un aumento significativo en la expresión de la proteína y la actividad MXR, ya que esto se

5. *Discusión*

ha observado tras 3-7 días después de tratamientos con compuestos tóxicos (Kurelec *et al.*, 1995; Minier & Moore 1996; Smital *et al.*, 2003).

También se estudió como variaban, estacionalmente, las tasas de depuración de OA, observándose baja actividad en mejillones suecos durante la estación invernal (Lindahl & Hageltorn, 1996), mientras que las tasas más rápidas fueron encontradas a finales de verano. Svensson (2003a) confirmó esta idea, al observar tasas de depuración más rápidas en verano, al ser comparadas con las de otoño. Se detectaron altos niveles de OA durante el período de otoño e invierno, seguido de una rápida reducción al principio de la primavera. La reducción de OA coincide con el afloramiento primaveral de diatomeas, lo que podría indicar que la alimentación con algas no tóxicas puede influir en la depuración.

Minier *et al.* (2006) fueron capaces de discriminar claramente un episodio de contaminación de la tendencia estacional de expresión MXR. Aunque también constataron que los niveles de P-gp son generalmente más altos en verano que en invierno, observaron un aumento repentino de la proteína MXR en enero, tras un corto período tormentoso con fuertes lluvias. En este caso, el aumento de la expresión de P-gp no estaba relacionado con la temperatura, por lo que podría ser el resultado de otros factores de estrés.

Por lo tanto, la estación anual debería ser un elemento a tener en cuenta en los estudios y a la hora de analizar los procesos de absorción y eliminación de toxinas. Se podría decir que la tasa de desintoxicación está influida por un factor que varía con la estación, teniendo en cuenta que los cambios asociados más notables serían las variaciones de temperatura, maduración gonadal, cantidad y características del alimento, o cambios asociados al consumo de oxígeno. Sería interesante tener en cuenta estos factores para posteriores investigaciones, en las que se pretenda analizar cómo influyen los distintos agentes en las tasas de depuración de toxinas.

Se ha de recordar que las variaciones de temperatura en el medio están fuertemente relacionados con los cambios de otros factores. Uno de los más rele-

5. *Discusión*

vantes e investigado es el número y variedad de especies fitoplanctónicas presentes, en cada momento, para la alimentación de los individuos.

Con el objetivo de favorecer la detoxificación en el mejillón, numerosos autores (Lindahl & Hageltorn, 1986; Edebo *et al.*, 1988; Haamer *et al.*, 1990) se basaron en la hipótesis de que la cantidad o la calidad de las fuentes de alimentos juega un papel esencial en la tasas de depuración de toxinas. Un estudio realizado por Sampayo *et al.* (1990) analizó varios episodios de DSP producidos por *Dinophysis* sp. en la costa portuguesa, sugiriendo que las tasas de depuración aumentaban con la concentración de fitoplancton. Marcaillou *et al.* (1993) estudiaron como la concentración de OA disminuía más rápido cuando los mejillones eran alimentados con un flujo continuo de agua de mar que contenía fitoplancton natural, al compararlos con otros a los que solo se les suministraba una ración de supervivencia.

Blanco *et al.* (1999) estudiaron si la tasa de alimentación, y el consecuente aumento en la tasa de defecación, aumentaría la velocidad de eliminación de toxinas. También analizaron la influencia de diferentes condiciones ambientales (salinidad, temperatura, transmisión de la luz, fluorescencia, el peso corporal del mejillón) en la depuración de OA. Se observó que la transmisión de luz y fluorescencia, indicadores de la materia en suspensión y por tanto del alimento, parecen tener el efecto más destacado de depuración. La relación inversa de la transmisión de la luz y la velocidad de depuración indica que el volumen de seston y, por lo tanto, la cantidad de alimento disponible para los mejillones, puede ser una variable que afecta realmente el proceso de depuración. La misma conclusión puede extraerse de la fluorescencia: su relación directa con las tasas de depuración también indica que la concentración de fitoplancton está implicada en la desintoxicación.

Sin embargo, este modelo no fue apoyado en un experimento de depuración en laboratorio llevado a cabo por Svensson (2003b), donde estudió como variaba la concentración de OA en los mejillones *M. edulis*, sometidos a tres condiciones experimentales (sin comida y con dos niveles de una mezcla de microalgas no tóxicas), durante 32 días. No encontró diferencias significativas

5. *Discusión*

entre los mejillones que fueron alimentados con los dos niveles de microalgas y los que se quedaron sin alimentación.

Marcaillou *et al.* (2010), debido a la diversidad de resultados obtenidos, relacionados con cómo afecta el alimento en las tasas de depuración, realizaron un nuevo experimento para procurar dilucidar esta cuestión. Se tuvieron en cuenta las recomendaciones formuladas en los estudios previos y los resultados negativos que se registraron. Finalmente, se observó un efecto positivo del suministro de alimentos en la tasa de descontaminación de mejillones; este efecto fue incrementado cuando había una mayor disponibilidad de comida.

No es posible sacar una conclusión clara sobre el efecto de los alimentos en la desintoxicación, debido a la heterogeneidad de las condiciones experimentales, la diversidad de los parámetros medidos y la alta variabilidad de los resultados obtenidos.

Por otra parte, diversos trabajos demostraron que el tamaño y la edad de los mejillones afecta a las tasas de ingestión, el consumo de oxígeno, la ración de alimento y las posibilidades y eficiencia de crecimiento (Thompson & Bayne, 1974; Bayne & Newell, 1983; Winter & Langton, 1976; Navarro & Winter, 1982). Se investigó, por ello, si el tamaño y la edad de los individuos podrían influir en las dinámicas de desintoxicación en el mejillón. La hipótesis era que los bivalvos más jóvenes tienen un metabolismo más rápido, por lo que, en iguales condiciones, podrían descontaminarse más rápidamente que los individuos mayores.

Blanco *et al.* (1999) encontraron una relación inversa entre la disminución de las concentraciones de toxina DSP en los mejillones y el peso corporal, sugiriendo que los mejillones pequeños tenían mayor capacidad de depuración, en comparación con los de mayor tamaño. Sin embargo, Duinker *et al.* (2007) analizaron la tasa de eliminación de toxina DSP entre mejillones de 1 y 2 años en condiciones naturales y no encontraron diferencias significativas, sugiriendo que el tamaño y la edad no afectan a la velocidad de depuración de las toxinas. Además, se analizó si las variaciones naturales en los niveles de alimento

5. *Discusión*

y la temperatura afectaban a la velocidad de eliminación de toxina DSP y no se encontró ninguna relación

También se realizaron varias investigaciones relacionadas con los cambios en la salinidad, ya que perturban el equilibrio basal, provocando la entrada y salida de agua e iones en las células. Con el fin de evitar los cambios asociados a estos flujos, los mejillones y otros bivalvos responden inmediatamente a las fluctuaciones externas de salinidad, mediante el cierre de la concha y un mantenimiento osmótico intracelular, por medio del ajuste de las concentraciones de iones, aminoácidos y otras pequeñas moléculas, para mantener las proporciones en las células relativamente constante.

Blanco *et al.* (1999) analizaron, entre otras cosas, como afectaba la variación de este elemento a la detoxificación. Se obtuvo una relación negativa entre la depuración y la salinidad, que podría ser debida, principalmente, a la disminución de la presión osmótica, aunque parece poco probable que esto afectase a la depuración de estas clases de compuestos, que son solubles en lípidos y muy propensos a estar unidos a los componentes celulares. Por el contrario, Keppler & Rinwood (2001), en una investigación realizada en el laboratorio, indicaron que la expresión de la P-gp no se veía afectada por la salinidad, mientras que Luedeking & Koehler (2004) hallaron que la expresión del gen *P-gp* se veía reducida ante la presencia de bajas salinidades.

Finalmente, cabe destacar los estudios que se hicieron para analizar como influye la concentración de lípidos en relación con las tasas de depuración. Un factor a tener en cuenta es que el porcentaje de lípidos está relacionado con la estación anual y el estado reproductivo. Además, en organismos poiquilothermos como los mejillones, el uso de las reservas de energía, para el mantenimiento del metabolismo, están fuertemente reguladas por la temperatura y la disposición de alimento.

Al exponer a los mejillones a ciertas variaciones, se supone que la demanda de energía y el metabolismo lipídico debería aumentar. Esto daría lugar a una velocidad de depuración más rápida de OA, es decir, una correlación positiva

5. *Discusión*

entre el contenido de lípidos y la concentración de toxina. Por otra parte, el OA es una molécula lipofílica, mientras que la glándula digestiva es un sitio importante para el almacenamiento de los lípidos en el mejillón. Por lo tanto, la afinidad que puede existir por los componentes celulares e intracelulares ricos en lípidos indica que la glándula digestiva es un tejido de alto almacenamiento de esta toxina. Probablemente, la ruta para la eliminación de toxina DSP se lleve a cabo a través de la pérdida fecal, como fue sugerido por Blanco *et al.* (1999), pudiendo estar relacionado el porcentaje lipídico con las tasas de depuración.

Svensson & Forlin (2004) analizaron varios grupos de mejillones sometidos a diferentes temperaturas y disponibilidad de alimento, por lo que presentaban distintos niveles de lípidos. Se observó que era un factor que no afectaba a las tasas de depuración, ya que había un aumento en el contenido de lípidos al final del muestreo, mientras que la concentración de OA continuaba disminuyendo.

Como se ha propuesto en esta y otras investigaciones, las proteínas MDR están implicadas en los procesos de desintoxicación. Por tanto, también es interesante conocer como varía su expresión, según los distintos factores que puedan provocar estrés en los animales.

Numerosos autores han dedicado sus trabajos a determinar qué compuestos influyen en la expresión de estos genes. Por ejemplo, Kurelec *et al.* (1995), Minier & Moore (1996b) indican que la regulación por incremento de los niveles de P-gp y su actividad en los mejillones se produce en respuesta a una variedad de productos químicos que son sustratos para el transportador, como clorotal, el herbicida dacthal o el PCP - pentaclorofenol. Sin embargo, la inducción de la P-gp también se produjo con compuestos que no son sustratos, por ejemplo, el pesticida DDE, el arsenito o el cadmio.

Las toxinas naturales también podrían contribuir a la expresión elevada de la P-gp. Se ha estudiado como varios productos naturales pueden interferir o inducir el sistema de transporte MXR (Toomey *et al.*, 1996). Extractos del alga

5. Discusión

verde *Caulerpa taxifolia* presentan sustratos para estas proteínas, que inhiben la actividad de la P-gp en el mejillón de agua dulce *Dreissena polymorpha* (Schröder *et al.*, 1998). Eufemia *et al.* (2000, 2002) también mostraron, en su investigación, como los extractos de diferentes especies de algas y fitoplancton contienen sustratos que regulan la expresión de los sistemas MXR en el mejillón *M. californianus*. Los niveles de P-gp en el mejillón cebra *Dreissena polymorpha* se han correlacionado con concentraciones de clorofila y feofitina en agua (Minier *et al.*, 2006; Pain & Parant, 2003b). Eufemia & Epel (2000) también realizaron una investigación donde demostraban como la síntesis de la P-gp está inducida por choques térmicos en *M. californianus*.

Por tanto, sería interesante conocer que factores y que compuestos podrían modificar y activar la expresión de estas proteínas, con el objetivo de que una mayor actividad de estos sistemas favoreciese las tasas de depuración de toxinas en los mejillones. Claro está: los compuestos que sirviesen para tal fin no deberían producir ninguna toxicidad en los humanos.

Por otra parte, la expresión del mRNA que codifica para la proteína P-gp puede ser utilizada como una indicación de los niveles relativos de síntesis de esta proteína en los organismos, siendo un componente importante de protección celular que proporciona una defensa, a través de este mecanismo, contra una amplia variedad de contaminantes y factores de estrés. Por tanto, se podría considerar como un biomarcador general de estrés medioambiental, ya que se activa ante la presencia de muchos factores, como las variaciones de temperatura o de la salinidad, anaerobiosis, radiación UV, exposición a metales y la presencia de sustancias tóxicas naturales o antropogénicas (Chin *et al.*, 1990; Minier *et al.*, 2000; Eufemia & Epel, 2000; Keppler & Ringwood, 2001; Ludeking & Kohler 2004; Achard *et al.*, 2004; Ivanina & Sokolova, 2008).

En conclusión, con este trabajo se ha confirmado la expresión de dos genes que codifican para dos proteínas MDR/ABCB en tres tejidos del mejillón *M. galloprovincialis* y como dicha expresión se ve afectada ante a una situación de presencia prolongada frente a toxinas naturales, como son el OA y sus derivados. Es la primera vez que se demuestra la inducción de los genes tipo *mdr* en

5. *Discusión*

moluscos bivalvos, ante la presencia de ácido okadaico. Además, también es la primera vez que se evalúa un conjunto de genes candidatos como genes de referencia para el análisis de la expresión del RNA en los mejillones *M. galloprovincialis*, por RT-qPCR, tanto para analizar la influencia de un afloramiento de fitoplancton tóxico como para hacer análisis donde se puedan comparar la expresión entre los tres tejidos.

Se ha confirmado que algunos genes utilizados tradicionalmente como normalizadores, en estudios de expresión, pueden conducir a resultados incorrectos, con perfiles de expresión variables para diferentes condiciones experimentales. Con este trabajo, es posible ofrecer unos resultados que ayuden a otros investigadores a identificar algunos genes de referencia candidatos para experimentos específicos en mejillones, destacando la importancia de una validación precisa de estos genes para cada nueva situación. Para los ocho genes evaluados, se encontró que existe algún grado de variabilidad para las condiciones ensayadas, aunque fue posible identificar los genes más adecuados como normalizadores durante esta situación, donde se compararon los diferentes tejidos.

5.4 **Perspectivas de futuro**

La aparición recurrente de episodios tóxicos de origen fitoplanctónico se ha convertido, en las últimas décadas, en un grave problema para el sector relacionado con el cultivo del mejillón. La aplicación práctica de esta investigación sería conseguir reducir las concentraciones de toxinas presentes en los organismos, bien porque los individuos no asimilasen tan fácilmente las toxinas –lo que podría ser debido a la función barrera y a una mayor actividad protectora de este tipo de proteínas– o bien porque se consiguiesen acelerar las tasas de depuración de las toxinas.

Los resultados del presente trabajo indican que las proteínas transportadoras de membrana de tipo P-gp/MDR participan en los procesos de eliminación de toxinas DSP en el mejillón. Esto no excluye que puedan existir otros mecanismos para la eliminación del ácido okadaico, entre ellos los que implican a

5. *Discusión*

los transportadores de tipo MRP. Por ello, sería interesante realizar investigaciones encaminadas a:

- Ver si hay otras vías de eliminación del ácido okadaico.
- Conocer la importancia cuantitativa de cada una de las vías de eliminación del ácido okadaico.

Otra forma de continuar estudiando cómo solucionar el problema sería la selección, mediante técnicas de mejora genética, de variedades de mejillón con menor capacidad de captación y/o de retención de las toxinas. No obstante, antes de la aplicación de estas técnicas, es necesario conocer si existe heredabilidad de este carácter, es decir, si las capacidades de captación y de retención de las toxinas son o no características que se transmiten de una generación a otra.

Para ello, paralelamente a nuestra investigación, pero bajo el mismo proyecto (EPITOX), se llevó a cabo un estudio sobre la “Producción en criadero de familias de mejillón para estudios genéticos” con el fin de disponer de familias de mejillón claramente identificadas y poder desarrollar un posterior programa de selección. Durante varios años se obtuvieron distintas cohortes, partiendo de varias familias de mejillón. Estas se han utilizado para realizar análisis genéticos e intentar comprobar si existe alguna relación entre las familias y la asimilación y depuración de la toxina.

La posible variación individual o poblacional y la relación que esta variación pueda tener con la diferente capacidad de eliminación de toxinas, asociado con los aspectos genéticos, podrían servir de apoyo para la formulación de planes de selección genética en función de la capacidad o velocidad de desintoxicación.

En este sentido, también sería interesante realizar un estudio relacionado con los SNP (*Single nucleotide polymorphisms* - polimorfismos de un solo nucleótido), que son una variación en la secuencia de DNA, afectando a una sola base. Se pueden localizar en cualquier gen y se cree que desempeñan un papel importante en las diferencias observadas entre individuos, pudiendo afectar a su ca-

5. *Discusión*

pacidad de transportar, metabolizar y responder frente a varias drogas y xenobióticos. Un SNP es una mutación puntual que provoca una variación del genoma; para que esta variación pueda ser considerada un SNP, debe ocurrir en al menos un 1% de la población. Los SNP, por lo general, ocurren aproximadamente cada 1.000 pares de bases en el genoma humano, pero también pueden ocurrir más frecuentemente en algunas regiones. Cada alelo difiere en una base del ADN y el producto proteico de cada gen puede diferir en un aminoácido. Aparentemente, el cambio de un aminoácido en la proteína puede inducir que se varíe su estructura y función lo suficiente como para provocar modificaciones en la función de la proteína, o de la ruta en la que esté implicada, o cambios en la afinidad de sustratos... Por tanto, un conocimiento detallado del polimorfismo y función del transportador será una importante herramienta para el conocimiento de la función de estas proteínas.

Ya se han investigado los niveles de asimilación y depuración del ácido okadaico de los distintos bivalvos. Por ejemplo, estudios que comparan niveles de contaminación mostraron que los mejillones acumulan DTX, un derivado del OA (apartado 1.2.4.1. *Toxinas lipofílicas responsables de intoxicaciones diarreicas*) más rápida e intensamente que otros bivalvos (Vale & Sampayo, 2002); o se han confirmado las bajas velocidades de depuración observadas en la vieira *Pecten maximus* (Blanco *et al.*, 2002). Sería interesante saber cuáles son las causas de todo este tipo de diferencias que se producen entre las distintas especies e individuos. Podría ser que la variedad en las secuencias de las proteínas tenga algo que ver. Por ejemplo: es posible que la región de la proteína encargada de reconocer los distintos sustratos haya variado a lo largo de la evolución y, por ello, algunos transportadores, en determinadas especies, tengan afinidad, o no, por determinadas moléculas.

Esto no deja de estar relacionado con la línea llevada a cabo en la producción de familias para estudios genéticos. Es probable que la presencia de un SNP modifique las características de las proteínas implicadas en la desintoxicación y que este carácter sea transmitido a través de distintas generaciones familiares. Por tanto, una combinación de ambas líneas de investigación podría ser

5. *Discusión*

interesante para intentar obtener algún tipo de familia que fuese más resistente a la presencia de toxina.

Por otra parte, como ya se ha comentado, sería importante saber qué factores y qué elementos pueden influir en la expresión del sistema MXR, para intentar favorecer la depuración de toxinas en los mejillones.

Una vía podría comenzar con el estudio de cómo se comportan los mejillones intoxicados en uno de los hábitats más variables e impredecibles de la tierra, la zona intermareal rocosa, situado en el límite entre los ambientes terrestres y marinos. Los mejillones dominan estas regiones en todo el mundo y, al ser sésiles, soportan numerosas situaciones de estrés, con grandes cambios de temperatura, de salinidad, disponibilidad de oxígeno y alimentos, debido a los ciclos diarios de las mareas y las variaciones climáticas.

Gracey *et al.* (2008) analizaron los cambios de expresión génica en el mejillón (*Mytilus californianus*) en las diferentes fases del ciclo de las mareas, observando que los mejillones intermareales presentan, al menos, cuatro estados fisiológicos distintos, que corresponden a una fase de metabolismo y respiración, una fase de división celular y dos de respuesta al estrés inducido por cambios medioambientales, moderado o severo. Los cambios transcripcionales son más pronunciados en los animales que habitan la zona supra-litoral. Esto sugiere que la expresión de determinadas proteínas está, en cierto modo, vinculado o amplificado por los factores ambientales prevalecientes, presentes con mayor intensidad y variabilidad en las regiones más expuestas a los cambios.

Por tanto, debido al estrés al que viven asociados los mejillones que habitan estas zonas, podrían ser unos ejemplares de muestreo idóneos para estudiar la expresión de sus genes. Sería interesante observar cómo se ven influenciadas las proteínas de detoxificación, bajo las condiciones generadas en este ambiente y los cambios a los que se ven sometidos. También se deberían analizar las relaciones de asimilación y depuración de las toxinas que pudiera haber en el medio, teniendo en cuenta los distintos factores de estrés a los que se ven sometidos, principalmente como pudieran afectar las reducidas oportuni-

5. *Discusión*

des para alimentarse en los individuos que habitan las regiones superiores y, por tanto, las concentraciones de toxinas fitoplanctónicas que pudieran ser asimiladas por los mejillones.

Además, sería interesante completar los estudios de toxicidad en diferentes tejidos, por ejemplo en la hemolinfa, para conocer su función protectora, o el borde del manto, debido a la presencia de los órganos sensibles. También se debería comparar la expresión de estos mecanismos en otras especies de bivalvos, ya que presentan ritmos de asimilación y depuración de las toxinas diferentes y podrían ayudar a entender qué rutas de protección se activan en cada situación. Además, se podrían realizar estudios con más contaminantes, para observar las diferentes reacciones que se generan frente a ellos.

Todo esto nos podría dar una mejor comprensión de las vías metabólicas relacionadas con la presencia de sustancias tóxicas en el ambiente. Por consiguiente, todavía hay mucho por investigar para poder conocer con mayor detalle el funcionamiento de los mecanismos de protección y la respuesta de los distintos individuos ante la presencia de contaminantes.

En definitiva, en mi opinión, las opciones que existen para intentar acelerar la desintoxicación en los mejillones pueden seguir distintas líneas de investigación. Por un lado, intentar obtener individuos más resistentes, o con capacidades de depuración más efectivas, mediante técnicas de mejora genética y estudios de SNP. Otra dirección sería realizar diferentes investigaciones para poder conocer los factores que ayuden a activar las tasas de depuración.

Se podrían analizar distintos compuestos naturales, no tóxicos, para ver su efecto o intentar llegar a conocer si realmente intervienen en los procesos y estudiar cómo los distintos factores ambientales influyen en la desintoxicación. Aquí se deberían seguir dos caminos: el primero sería conocer la respuesta de los mejillones en el medio, comparando cómo afectan las toxinas a mejillones de roca frente a los de la batea; incluso se deberían realizar muestreos por profundidades, ya que esto serviría para evaluar la influencia de los distintos factores y de los cambios medioambientales.

5. *Discusión*

A continuación, se podrían hacer estudios de acondicionamiento en el laboratorio, variando diferentes elementos que puedan generar estrés, como temperatura, luz, salinidad, oxígeno, desecación, presencia de predadores o compuestos químicos liberados por ellos, composición y disponibilidad de alimento, o el movimiento del medio, como ocurriría en el mar.

Si finalmente se consiguiese acelerar la depuración, podría ser una interesante alternativa para la gestión de mejillones tóxicos, con el fin de garantizar un suministro continuo de mejillones en el mercado. De todas formas, se debería tener en cuenta el volumen de ejemplares, dónde se llevaría a cabo este proceso y los tiempos requeridos para alcanzar los niveles óptimos de concentración de toxinas, con vistas a su posterior consumo, para evaluar si es económicamente rentable, teniendo en cuenta todos estos factores.





6. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron las secuencias completas de cDNA que codifican para dos proteínas transportadoras ABC en el mejillón *M. galloprovincialis*. Los análisis de similitud frente a otras secuencias presentes en las bases de datos indican que se trata de proteínas MDR (multirresistencia frente a drogas o fármacos) pertenecientes a la subfamilia ABCB. El cDNA que codifica para la MDR1 está formado por una secuencia de 4271 pb con un marco abierto de lectura de 3924 nucleótidos, que codifican para una proteína de 1307 aminoácidos. En el caso de la MDR2, el cDNA consta de 4417 pb, con un marco abierto de lectura de 4104 nucleótidos, que codifican para una proteína de 1367 aminoácidos.

2. El estudio de los dominios conservados y de la topología en relación a la membrana, junto con el análisis filogenético, confirman que estamos ante proteínas transportadoras ABCB (MDR). Ambas proteínas son transportadores completos con dos dominios transmembrana y dos dominios de unión al nucleótido. Cada dominio transmembrana está formado por 6 α -hélices transmembrana y cada dominio de unión al nucleótido presenta regiones altamente conservadas, características de esta familia, como el Walker A, el Walker B, el motivo C y los bucles A, Q, D y H.

3. Tras evaluar 8 posibles genes de referencia (*gapdh*, *rps4*, *rps27*, *cox1*, *tif5a*, *act*, *18S* y *nd4*) con tres programas diferentes (geNorm, NormFinder y Best-keeper), se encontró que los genes más estables para la normalización de los datos de expresión son:

- para los tres tejidos en conjunto: *gapdh*, *rps4*, *rps27* y *cox1*.
- para glándula digestiva: *gapdh*, *rps4* y *cox1*.
- para branquia: *gapdh*, *rps4* y *cox1*.
- para manto: *gapdh*, *rps4* y *rps27*.

4. El estudio de expresión comparativo de los diferentes tejidos del animal indica una expresión similar del gen *mdr1* en glándula digestiva, branquia y manto, mientras que el nivel de expresión del gen *mdr2* es significativamente

6. Conclusiones

mayor en la branquia que en cualquiera de los otros dos tejidos, sugiriendo su actividad como tejido barrera.

5. Los resultados obtenidos del análisis de la expresión de estos genes indican un aumento significativo de la expresión del gen *mdr1* en presencia de ácido okadaico, en relación al control sin toxina, tanto en la branquia como en la glándula digestiva. Esto sugiere que estos tejidos podrían ser los principales responsables en la respuesta frente a las biotoxinas en el organismo. En el gen *mdr2*, el incremento de la expresión inducido por la presencia de ácido okadaico se produce únicamente en branquia, lo que confirma la posible función barrera de este tejido. Por el contrario, en el manto no se encontraron cambios significativos de los niveles de expresión para ninguno de los dos genes, lo que refleja la menor implicación de este tejido en los procesos de intoxicación y desintoxicación.

7. BIBLIOGRAFÍA

Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P. 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquatic Toxicology*. 67: 347-357.

Allikmets, R., Gerrard, B., Hutchinson, A., Dean, M. 1996. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Human Molecular Genetics*. 5: 1649-1655.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25(17): 3389-402.

Ambudkar, S.V., Kim, I.W., Xia, D., Sauna, Z.E. 2006. The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. *FEBS Letters*. 580: 1049-55.

Amengual, J. 1989. Mollusc sanitation and marketing in Spain (Higiene y comercialización del molusco en España). Report of the Workshop and Study Tour on Mollusc Sanitation and Marketing, 160-209. Project: FAO-FI-RAS /86/024. Regional Seafarming Development and Demonstration Project, Asia. Microfiche no: 297327-333.

Andersen, C.L., Jensen, J.L., Orntoft, T.F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*. 64(15): 5245-5250.

Andersen, P. 1996. Design and implementation of some harmful algal monitoring systems. IOC Technical Series no. 44. UNESCO, 102 pp.

7. Bibliografía

Anderson, D.M. 2009. Approaches to monitoring, control and management of harmful algal blooms (HABs). *Ocean and Coastal Management*. 52: 342-347.

Anderson, D.M., Sullivan, J.J., Reguera, B. 1989. Paralytic shellfish poisoning in Northwest Spain: the toxicity of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Toxicon*. 27: 665-674.

Aoki, T., Naka, H., Katagiri, T., Hirono, I. 2000. Cloning and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNA of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*. 66: 737-742.

Araya, M.T., Siah, A., Mateo, D., Markham, F., McKenna, P., Johnson, G., Berthe, F.C.J. 2008. Selection and evaluation of housekeeping genes for haemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 99: 326-331.

Artigas, P. & Gadsby, D.C., 2003. From the Cover: Na⁺/K⁺ pump ligands modulate gating of palytoxin-induced ion channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 501-505.

Azzaria, M., Schurr, E., Gross, P. 1989. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Molecular and Cellular Biology*. 9: 5289-5297.

Banni, M., Dondero, F., Jebali, J., Guerbej, H., Boussetta, H., Viarengo, A. 2007. Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein *mt10* and *mt20* expression: A validation along the Tunisian coast. *Biomarkers*. 12: 369-383.

Barnabé, G. 1991. *Acuicultura*. Ed. Omega. Tomos I y II: 1099 pp.

Bard, S.M. 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic toxicology*. 48: 357-389.

7. Bibliografía

- Barsalobres-Cavallari, C.F., Severino, F.E., Maluf, M.P., Maia, I.G. 2009. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. BMC Molecular Biology. 10: 1.
- Bayne, B.L., & Newell R.C. 1983. Physiological energetics of marine mollusks. En: The Mollusca. Saleuddin A.S.M. & Willow K.M. Eds. Academic. Vol. 4, Part 1. 407-515.
- Beaumont, A.R., Turner, G., Wood A.R., Skibinski, D.O.F. 2004. Hybridizations between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* and performance of pure species and hybrid veliger larvae at different temperatures. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 302: 177-188.
- Besada, E.G., Loeblich, L.A. & Loeblich III, A.R. 1982. Observations on tropical, benthic dinoflagellates from ciguatera-endemic areas: *Coolia*, *Gambierdiscus*, and *Ostreopsis*. Bulletin of Marine Science. 32: 723-735.
- Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, M.K., Poolman, B. 2006. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. FEBS Letters. 580: 1023-1035.
- Blanco, J. 2001. Episodios nocivos por fitoplancton. En: Los moluscos pectínicos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Eds. Maeda-Martínez. Editorial Limusa Capítulo 15: 285-324.
- Blanco, J., Fernández, M.L., Míguez, A., Moroño, A. 1999. Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions. Marine Ecology Progress Series. 176: 153-163.
- Blanco, J., Acosta, C.P., Bermúdez de la Puente, M., Salgado, C. 2002. Depuration and anatomical distribution of the amnesic shellfish poisoning

7. Bibliografía

(ASP) toxin domoic acid in the king scallop *Pecten maximus*. Aquatic Toxicology. 60 (1-2): 111-121.

Blanco, J., Moroño, A., Fernández, M.L. 2005. Toxic episodes in shellfish, produced by lipophilic phycotoxins: An overview. Revista Galega de Recursos Mariños (Monog.). 1: 1-70.

Blanco, J., Álvarez, G. & Uribe, E. 2007a. Identification of pectenotoxins in plankton, filter feeders, and isolated cells of a *Dinophysis acuminata* with an atypical toxin profile, from Chile. Toxicon. 49: 710-716.

Blanco, J., Mariño, C., Martín, H., Acosta, C.P. 2007b. Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Toxicon. 50: 1011-1018.

Branch, G.M. & Steffani, C.N. 2004. Can we predict the effects of alien species? A case-history of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 300, 189-215.

Bricelj, M. V. & Shumway, S. E. 1998. Paralytic shellfish toxins in bivalve molluscs: occurrence, transfer kinetics and biotransformation. Reviews in Fisheries Science. 6 (4): 315-383.

Brinkhof, B., Spee, B., Rothuizen, J., Penning, L.C. 2006. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. Analytical Biochemistry. 356: 36-43.

Buratti S, Franzellitti S, Poletti R, Ceredi A, Montanari G, Capuzzo A, Fabbri E. 2011. Bioaccumulation of algal toxins and changes in physiological parameters in Mediterranean mussels from the North Adriatic Sea (Italy). Environmental Toxicology. doi: 10.1002/tox.20739.

7. Bibliografía

Bustin, S.A. & Nolan, T. 2004. Analysis of mRNA Expression by Real-Time PCR. En: Real-Time PCR; An Essential Guide. Edwards K.J., Logan J. & Saunders N. Eds. Horizon Bioscience. 125-184.

Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*. 25: 169-193.

Bustin, S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*. 29: 23-39.

Bustin, S.A. 2005. Real-Time PCR. En: Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics. Podda M. & Fuchs J., Eds. Marcel Dekker. 1131-1135.

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandensompele, J., Wittwer C.T. 2009. The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. Vol. 55, n. 4: 611-622.

Carmody, E.P., James, K.J. & Kelly, S.S. 1995. Diarrhetic shellfish poisoning: Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay methods for dinophys toxin-2 determination. *Journal of AOAC International*. 78: 1403-1408.

Cellura, C., Toubiana, M., Parrinello, N., Roch, P. 2006. HSP70 gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*. *Developmental and Comparative Immunology*. 30: 984-997.

Cembella, A.D., Quilliam, M.A., Lewis, N.I., Bauder, A.G., Wright, J.L.C. 1998. Identifying the planktonic origin and distribution on spirolides in coastal Nova Scotian waters. En: Harmful Algae. Reguera, B., Blanco, J., Fernández,

7. Bibliografía

M.L., Wyatt, T. Eds. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 481-484.

Chan, L.M., Lowes, S. & Hirst, B.H. 2004. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 21: 25-51.

Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M. 1986. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*. 47: 381-389.

Chen, J., Sharma, S., Quioco, F.A, Davidson, A.L. 2001. Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: Evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 98: 1525-1530.

Chin, K.V., Tanaka, S., Darlington, G., Pastan, I., Gottesman, M.M. 1990. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *Journal of Chemical Biology*. 265: 221-226.

Choudhuri, S. & Klaassen, C.D. 2006. Structure, Function, Expression, Genomic Organization, and Single Nucleotide Polymorphisms of Human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) Efflux Transporters. *International Journal of Toxicology*. 25: 231-259.

Cole, S.P. & Deeley, R.G. 1998. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. [Review]. *Bioessays*. 20: 931-940.

Comisión Europea 2011. Reglamento (UE) N° 15/2011 de la Comisión del 10 de enero de 2011 por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 2074/2005 en lo relativo a los métodos de análisis reconocidos para la detección de biotóxi-

7. Bibliografía

nas marinas en moluscos bivalvos vivos Diario Oficial de la Unión Europea L 6/3.

Consello Regulador Mexillón de Galicia. 2010. www.mexillondegalicia.org

Cornwall, R., Toomey, B.H., Bard, S., Bacon, C., Jarman, W.M., Epel, D. 1995. Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. *Aquatic Toxicology*. 31: 277-296.

Corral, J. 1992. Las rías gallegas como ecosistema. Santiago de Compostela. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura. Tema 1. 39 pp.

Cubero-León, E., Minier, C., Rotchell, J.M., Hill, E.M. 2012. Metabolomic analysis of sex specific metabolites in gonads of the mussel, *Mytilus edulis*. *Comparative Physiology and Biochemistry. Part D: Genomics Proteomics*. 7(2): 212-219.

Da Silva, A. & Pieniazek, N. 2003. Latest Advances and Trends in PCR-based Diagnostic Methods. En: *Textbook-Atlas of Intestinal Infections in AIDS*. Dionisio, D. Ed. Springer. 397-412.

Dano, K. 1973. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 323: 466-483.

De Zwaan, A., Mathieu, M. 1992. Cellular energy metabolism in the Mytilidae: an overview. En: *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Gosling, E. Ed. Elsevier. 223-307.

Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*. 11: 1156-1166.

7. Bibliografía

Deeley, R.G., Westlake, C. & Cole, S.P. 2006. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiological Reviews*. 86: 849-899.

Deindl, E., Boengler, K., van Royen, N., Schaper, W., 2002. Differential expression of GAPDH and beta3-actin in growing collateral arteries. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 236: 139-146.

Desbiens, M. & Cembella, A. 1993. Growth of the blue mussel *Mytilus edulis* on toxic *Alexandrium fundyense* and effects of gut passage on dinoflagellate cells. En: Toxic phytoplankton blooms in the sea. Smayda, T.J. & Shimizu, Y. Eds. Elsevier Science. 395-399.

Dheilly, N.M., Lelong, C., Huvet, A., Favrel, P. 2011. Development of a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) 31,918-feature microarray: identification of reference genes and tissue-enriched expression patterns. *BMC Genomics*. 12: 468 pp.

Díaz, M., Furey, A., Lehane, M., Brana, A., James, K.J., 2004. Detection of six new azaspiracids in shellfish using liquid chromatography with multiple tandem mass spectrometry. En: Harmful Algae 2002. Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A. Eds. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 204-206.

Dondero, F., Piacentinia, L., Banni, M., Rebelo, M., Burlando, B., Viarengo, A. 2005. Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene*. 345: 259-270.

Duinker, A., Bergslien, M., Strand, O., Olseng, C.D., Svardal, A. 2007. The effect on size and age on depuration rates of diarrhetic shellfish toxins (DST) in mussels (*Mytilus edulis* L.). *Harmful Algae*. 6: 288-300.

Durán, C., Acuña, R., Caamaño, J.S. 1990. El mejillón: biología, cultivo y comercialización. Fundación Caixa Galicia (Aula del Mar). 184 pp.

7. Bibliografía

Edebo, L., Lange, S., Li, X.P., Allenmark, S., Lindgren, K., Thompson, R. 1988. Seasonal, geographic and individual variation of okadaic acid content in cultivated mussels in Sweden. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*. 96: 1036-1042.

Endicott, J.A. & Ling, V. 1989. The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Annual Review of Biochemistry*. 58: 137-171.

Epel, D. 1998. Use of multidrug transporters as first lines of defense against toxins in aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*. 120: 23-28.

Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C.N., MacManus-Spencer, L.A., Hamdoun, A., Smital, T. 2008. Efflux transporters: Newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environmental Science & Technology*. 42(11): 3914-3920.

Escudeiro Rossignoli, A. 2012. Acumulación de toxinas DSP en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*. http://dspace.usc.es/bitstream/10347/3632/1/9788498877922_content.pdf. Tesis doctoral. Universidade de Santiago de Compostela. 164 pp.

Eufemia, N., Clerte, S., Girshick, S., Epel, D. 2002. Algal products as naturally occurring substrates for p-glycoprotein in *Mytilus californianus*. *Marine Biology*. 140: 343-353.

Eufemia, N., Girshick, S., Epel, D. 2000. Algal products as naturally occurring modulators for the multidrug resistance (MDR) transporter. *Marine Environmental Research*. 50 (1-5): 332-333.

Eufemia, N.A. & Epel, D. 2000. Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. *Aquatic Toxicology*. 49: 89-100.

7. Bibliografía

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2004a. The State of World Fisheries and Aquaculture. Roma.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2004b. Marine Biotoxines. Roma. Paper 80.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2012a. Fisheries & Aquaculture Department. Summary tables of fishery statistics: Capture, aquaculture, commodity and food balance sheets. Yearbook of Fishery Statistics. World aquaculture production by culture environment.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2012b. Fisheries & Aquaculture Department. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mytilus_galloprovincialis/es

Feder, M.E. & Hofmann, G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and stress response: evolutionary and ecological physiology. Annual Review of Physiology. 61: 243-282.

Fernández-Reiriz, M.J. & Labarta, U. 2004. Procesos Fisiológicos y Disponibilidad de Alimento del Mejillón en las Rías Gallegas. En: Bateiros, mar, mejillón. Una perspectiva bioeconómica. Labarta, U., Fernández Reiriz, M.J., Pérez Camacho, A., Pérez Corbacho, E. Fundación Caixa Galicia. Edit. Galaxia, S. A. 49-77.

Figueiras, F.G., Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J. 2002. Coastal upwelling, primary production and mussel growth in the Rías Baixas of Galicia. Hydrobiologia. 484: 121-131.

Figueras, A. 2007. Biología y cultivo del mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) en Galicia. Biblioteca de Ciencias (CSIC), Sociedad Anónima de Fotocomposición. 282 pp.

7. Bibliografía

- Fisher, S.W., Gossiaux, D.C., Bruner, K.A., Landrum, P.F. 1993. Investigations of the toxicokinetics of hydrophobic contaminants in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). En: *Zebra Mussels, Biology, Impacts, and Control*. Nalepa, T.F. & Schloesser, D.W. Eds. Lewis Publishers. 465-489.
- Franco, J.L., Trivella, D.B., Trevisan, R., Dinslaken, D.F., Marques, M.R., Bainy, A.C., Dafre, A.L. 2006. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc. *Chemico-Biological Interactions*. 160(3): 232-240.
- Franco, J.M. 2006a. Entendiendo las mareas rojas. *Pesca Internacional*. 65: 18-20.
- Franco, M. 2006b. La miticultura en Galicia: una actividad de éxito y con futuro. *Revista Galega de Economía*. Vol. 15, n. 1: 1-6.
- Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D., Jöhncke, U. 1994. The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere*. 29: 1501-1514.
- Franzellitti, S. & Fabbri, E. 2006. Cytoprotective responses in the Mediterranean mussel exposed to Hg²⁺ and CH₃Hg. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 351: 719-725.
- Frelet, A. & Klein, M. 2006. Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis. *FEBS Letters*. 580: 1064-1084.
- Fromm, M.F. 2004. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends in Pharmacological Sciences*. 25(8): 423-429.
- Fujiwara, H. & Ishikawa, H. 1986. Molecular mechanism of introduction of the hidden break into the 28S rRNA of insects: implication based on structural studies. *Nucleic Acids Research*. 14(16): 6393-6401.

7. Bibliografía

Gabe, M. 1968. *Techniques Histologiques*. Masson et Cie. Eds. 1113 pp.

Galgani, F., Cornwall, R., Toomey, B.H., Epel, D.D. 1996. Interaction of environmental xenobiotics with a multixenobiotic defense mechanism in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* from the coast of California. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 15: 325-331.

Georges, E., Bradley G., Garipey J., Ling, V. 1990. Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87: 152-156.

Gibson, U.E., Heid, C.A., Williams, P.M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*. 6: 1095-1101.

Gossiaux, D.C., Landrum, P.F., Fisher, S.W. 1996. Effect of temperature on the accumulation kinetics of PAHs and PCBs in the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*. *The Journal of Great Lakes Research*. 22 (2): 379-388.

Gracey, A.Y., Chaney, M.L., Boomhower, J.P., Tyburczy, W.R., Connor, K., Somero, G.N. 2008 Rhythms of gene expression in a fluctuating intertidal environment. *Current Biology*. 18: 1501-1507.

Haamer, J., Andersson, P.O., Lange, S., Li, X.P., Edebo, L. 1990. Effects of transplantation and reimmersion of mussels *Mytilus edulis* Linnaeus, 1728, on their contents of okadaic acid. *Journal of Shellfish Research*. 9: 109-112.

Hallegraeff, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia*: 32, 79-99.

Hallegraeff, G.M., 1995. Harmful algal blooms: a global overview. En: *Manual on harmful marine microalgae*. Hallegraeff, G.M., Anderson D.M. & Cembella A. Eds. UNESCO. 1-22.

7. Bibliografía

- Hansen, M.C., Nielsen, A.K., Molin, S., Hammer, K., Kilstrup, M. 2001. Changes in rRNA levels during stress invalidates results from mRNA blotting: fluorescence in situ rRNA hybridization permits renormalization for estimation of cellular mRNA levels. *Journal of Bacteriology*. 183: 4747-4751.
- Hellemans, J., Mortier, G., Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*. 8: 19 pp.
- Helm, M.M., Bourne, N., Lovatelli, A. 2004. Hatchery culture of bivalves - A practical manual. FAO Fisheries Technical. Paper 471.
- Hennessy, M. & Spiers, J.P. 2007. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacological Research*. 55(1): 1-15.
- Higgins C.F., Haag, P.D., Nikaido, K., Ardeshir, F., García, G., Ames, G.F. 1982. Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. *Nature*. 298: 723-727.
- Higgins, C.F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*. 8: 67-113.
- Higgins, C.F. 2007. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*. 446: 749-757.
- Higgins, D., Thompson, J. & Gibson, T. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.
- Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Germann, U.A., Cheng, P.W., Pastan, I., Gottesman, M.M. 1999. Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric. *Biochemistry* 38: 13887-13899.

7. Bibliografía

Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., McLachlan, J.L., Wright, J.L.C. 1995a. Two new water-soluble DSP toxin derivatives from the dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: possible storage and excretion products. *Tetrahedron Letters*. 36: 9273-9276.

Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., Wright, J. 1995b. Identification of DTX-4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 5: 597-599.

Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A. 2005. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes and Immunity*. 6: 279-284.

Hyde S.C., Emsley P., Hartshorn M.J., Mimmack M.M., Gileadi U., Pearce S.R., Gallagher M.P., Gill D.R., Hubbard R.E., Higgins C.F. 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*. 346: 362-365.

IFREMER. <http://en.aquaculture.ifremer.fr/Sectors/Mollusc-sector/Discoveries/Mussels>

Infante, C., Matsuoka, M.P., Asensio, E., Cañavate, J.P., Reith, M., Manchado, M. 2008. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*. 9: 28 pp.

Ishida, N., Watai, M., & Semura, H. 1998. Studies on various administration routes of xenobiotics into bay scallop (*Pecten albicans*). *Bulletin of the National Research Institute of Fisheries Science*. 11: 99-110.

Ivanina, A.V. & Sokolova, I.M. 2008. Effects of cadmium exposure on expression and activity of P-glycoprotein in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquatic Toxicology*. 88(1): 19-28.

7. Bibliografía

James, M.O. 1987. Conjugation of organic pollutants in aquatic species. *Environmental Health Perspectives*. 71: 97-103.

James, K.J., Furey, A., Lehane, M., Ramstad, H., Aune, T., Hovgaard, P., Morris, S., Higman, W., Satake, M., Yasumoto, T. 2002. First evidence of an extensive northern European distribution of azaspiracid poisoning (AZP) toxins in shellfish. *Toxicon*. 40: 909-915.

Janovick-Guretzky, N.A., Dann, H.M., Carlson, D.B., Murphy, M.R., Loor, J.J., Drackley, J.K. 2007. Housekeeping gene expression in bovine liver is affected by physiological state, feed intake and dietary treatment. *Journal of Dairy Science*. 90: 2246-2252.

Juliano, R.L. & Ling, V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 455: 152-162.

Kägi, J.H.R. & Schäffer, A. 1988. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*. 27: 8509-8515.

Käll, L., Krogh, A., Sonnhammer, E.L.L. 2004. Phobius: a combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *Journal of Molecular Biology*. 338: 1027-1036.

Kartner, N., Evernder-Porella, E., Bradley, G., Ling, V. 1985. Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature*. 316: 820-823.

Kemp, S. 2011. ABCD proteins. <http://www.x-ald.nl/biochemistry-genetics/abcd-proteins/>

Keppler, C.J. & Ringwood, A.H. 2001. Expression of P-glycoprotein in southeastern oysters, *Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Research*. 52: 81-96.

7. Bibliografía

Kingtong, S., Chitramvong, Y., Janvilisri, T. 2007. ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. *Aquatic Toxicology*. 85: 124-132.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 27(2-3): 95-125.

Kudela, R., Pitcher, G., Probyn, T., Figueiras, F., Moita, T., Trainer, V. 2005. Harmful Algal Blooms in coastal upwelling systems. *Oceanography*. 18(2): 184-197.

Kurelec, B. 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Critical Reviews in Toxicology*. 22: 23-43.

Kurelec, B. 1995a. Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences. *Science of The Total Environment*. 171: 197-204.

Kurelec, B. 1995b. Reversion of the multixenobiotic resistance mechanism in gills of a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* by a model inhibitor and environmental modulators of p170-glycoprotein. *Aquatic Toxicology*. 33: 93-103.

Kurelec, B., Krca, S., Lucic, D. 1995. Expression of multixenobiotic resistance mechanism in a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of exposure to polluted environments. *Comparative Physiology and Biochemistry*. 113C (2): 283-289.

Kurelec B., Britvic S., Krca S., & Zahn R. K. 1986. Metabolic fate of aromatic amines in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Biology*. 91: 523-527.

7. Bibliografía

Kurelec, B. & Pivcevic, B. 1989. Distinct glutathione-dependant enzyme activities and a verapamil-sensitive binding of xenobiotics in a fresh-water mussel *Anodonta cygnea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 164: 934-940.

Labarta, U. 2004. El mejillón, un paradigma bioeconómico. En: Bateiros, mar, mejillón. Una perspectiva bioeconómica. Labarta, U., Fernández Reiriz, M.J., Pérez Camacho, A., Pérez Corbacho, E. Eds. Fundación Caixa Galicia. Edit. Galaxia, S. A. 19-47.

Lee, J.S., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *Journal of Applied Phycology*. 1: 147-152.

Leslie, E.M., Deeley, R.G. & Cole, S.P.C. 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 204: 216-237.

Lindahl, O. & Andersson, B. 1996. Environmental factors regulating the occurrence of *Dinophysis* spp. in the Koljöfjord, Sweden. En: Harmful and toxic algal blooms. Yasumoto, T., Oshima Y. & Fukuyo Y. (Ed.) Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 269-272.

Lindahl, O. & Hageltorn, M. 1986. Detoxification experiment of DSP in blue mussels. En: Proc. 4th Nordic Veterinary Congress, Stockholm. 463-466.

Ling, D. & Salvaterra, P.M. 2011. Robust RT-qPCR Data Normalization: Validation and Selection of Internal Reference Genes during Post-Experimental Data Analysis. *PLOS ONE* 6(3): e17762.

Linton, K.J. & Higgins, C.F. 2007. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *European Journal of Physiology*. 453: 555-567.

7. Bibliografía

Linton, K.L. 2007. Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology*. 22: 122-130.

Livingstone, D.R. & Pipe, R.K. 1992. Mussels and environmental contaminants: molecular and cellular aspects. En: *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Gosling, E. Ed. Elsevier Science Publishers. 425-464.

Loo, T.W., Bartlett, M.C. & Clarke, D.M. 2002. The "LSGGQ" motif in each nucleotide binding domain of human P-glycoprotein is adjacent to the opposite walker A sequence. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 41303-41306.

Luckenbach, T. & Epel, D. 2008. ABCB and ABCC type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 294: 1919-2199.

Luedeking, A. & Koehler, A. 2004. Regulation of expression of multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*. 69(1): 1-10.

Luedeking, A., Van Noorden, C.J.F. & Koehler, A. 2005. Identification and characterisation of a multidrug resistance-related protein mRNA in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series*. 286: 167-175.

MacKenzie, L., Holland, P., McNabb, P., Beuzenberg, V., Selwood, A., Suzuki, T. 2002. Complex toxin profiles in phytoplankton and greenshell mussels (*Perna canaliculus*), revealed by LC-MS/MS analysis. *Toxicon*. 40: 1321-1330.

MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). 2012. http://www.magrama.gob.es/app/jacumar/datos_produccion/Documentos/Especies/CCAA/GALICIA_PRODUCION_MEJILLON_MEDITERRANEO.pdf

7. Bibliografía

Manduzio, H. 2004. Etude des modifications d'expression protéique sous l'effet d'un stress environnemental chez deux bivalves estuariens, la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) et la moule bleue (*Mytilus edulis*): suivi de marqueurs de défense cellulaire et approche protéomique. Thèse de doctorat de l'Université du Havre. 337 pp.

Manfrin, C., Dreos, R., Battistella, S., Beran, A., Gerdol, M., Varotto, L., Lanfranchi, G., Venier, P., Pallavicini, A. 2010. Mediterranean mussel gene expression profile induced by okadaic acid exposure. *Environmental Science & Technology*. 1; 44 (21): 8276-83.

Marcaillou-Le Baut, C., Bardin, B., Bardouil, M., Bohec, M., Le Dean, L., Masselin, P., Truquet, P. 1993. DSP depuration rates of mussels reared in a laboratory and an aquaculture pond. En: *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Smayda, T. & Shimizu, Y. Eds. Elsevier. 531-536.

Marcaillou-Le Baut, C., Haure, J., Mondeguer, F., Courcoux, A., Dupuy, B., Penisson, C. 2010. Effect of food supply on the detoxification in the blue mussel, *Mytilus edulis*, contaminated by diarrhetic shellfish toxins. *Aquatic Living Resources*. 23(3): 255-266.

Mauriz, O., Maneiro, V., Pérez-Parallé, M.L., Sánchez, J.L. Pazos A.J. 2012. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies on the gonad of the bivalve mollusc *Pecten maximus* L. *Aquaculture*. 370-371:158-165.

McCarron, P., Kilcoyne, J. & Hess P. 2008. Effects of cooking and heat treatment on concentration and tissue distribution of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in mussels (*Mytilus edulis*). *Toxicon*. 51: 1081-1089.

McFadzen, I., Eufemia, N., Heath, C., Epel, D., Moore, M.N., Lowe, D. 2000. Multidrug resistance in the embryos and larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*. 50: 319-323.

7. Bibliografía

Miles, C.O. 2007. Pectenotoxins. Capítulo 9. En: Phycotoxins – Chemistry and Biochemistry. Botana, L. Ed. Blackwell Publishing. 159-186.

Minier, C., Akcha, F. & Galgani, F. 1993. P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. Comparative Physiology and Biochemistry. 106: 1029-1036.

Minier, C. & Moore, M.N. 1996a. Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in mussel blood cells: effects of exposure to vincristine. Marine Ecology Progress Series. 142: 165-173.

Minier, C. & Moore, M.N. 1996b. Induction of multixenobiotic resistance in mussel blood cells. Marine Environmental Research. 42 (1-4): 389–392.

Minier, C., Eufemia, N. & Epel, D. 1999. The multi-xenobiotic resistance phenotype as a tool to biomonitor the environment. Biomarkers. 4: 442–454.

Minier, C., Borghi, V., Moore, M.N., Porte, C. 2000. Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology. 50: 167-176.

Minier, C., Lelong, C., Djemel, N., Rodet, F., Tutundjian, R., Favrel, P., Mathieu, M., Leboulenger, F. 2002. Expression and activity of a multixenobiotic resistance system in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Marine Environmental Research. 54(3-5): 455-459.

Minier, C., Abarnou, A., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A.M., Tutundjian, R., Bocquene, G., Leboulenger, F. 2006. A pollution monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Environmental Toxicology and Chemistry. 25: 112-119.

Moore, M.N. 1990. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. Histochemical Journal. 22: 187-191.

7. Bibliografía

Moore, M.N. & Willows, R.I. 1998. A model for cellular uptake and intracellular behaviour of particulate-bound micropollutants. *Marine Environmental Research*. 46: 509-514.

Morga, B., Arzul, I., Faury, N., Renault, T. 2010. Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR. *Fish and Shellfish Immunology*. 29(6): 937-945.

Moroño, A., Arévalo, F., Fernández, M.L., Maneiro, J., Pazos, Y., Salgado, C., Blanco, J. 2003. Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* (LMK) during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*. *Aquatic Toxicology*. 62: 269-280.

Mullis, K. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 262 (4): 56-65.

Murata, M., Shimitami, M., Sugitani, H., Oshima, Y., Yasumoto, T. 1982. Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 48: 549-552.

Navarro, J.M. & Winter, J.E. 1982. Ingestion rate, assimilation efficiency and energy balance in *Mytilus chilensis* in relation to body size and different algal concentrations. *Marine Biology*. 67: 255-266.

Navarro, A., Weißbach, S., Faria, M., Barata, C., Piña, B., Luckenbach, T. 2012. Abcb and Abcc transporter homologs are expressed and active in larvae and adults of zebra mussel and induced by chemical stress. *Aquatic toxicology*. 122-123: 144-152.

Neyfakh, A.A. 1988. Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. *Experimental Cell Research*. 174: 168-176.

OESA (Observatorio Español de Acuicultura), Fundación. Anuario 2011. 192 pp.

7. Bibliografía

Olsvik, P.A., Lie, K.K., Jordal, A.E.O., Nilsen, T.O., Hordvik, I. 2005. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Molecular Biology*. 6: 21.

Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasolofonirina, N., Ratsimaloto, N., Naoki, H., Yasumoto, T. 1999. Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. *Toxicon*. 37: 55-65.

Orelle, C., Dalmas, O., Gros, P., Di Pietro, A., Jault, J.M. 2003. The conserved glutamate residue adjacent to the Walker-B motif is the catalytic base for ATP hydrolysis in the ATP-binding cassette transporter BmrA. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 47002-47008.

Pain, S. & Parant, M. 2003a. Le mécanisme de défense multixénobiotique (MDMX) chez les bivalves. *Comptes Rendus Biologies*. 326: 659-672.

Pain, S. & Parant, M. 2003b. Response of multixenobiotic defence mechanism in *Dreissena polymorpha* exposed to environmental stress. *Chemosphere*. 52: 1105-1113.

Parant, M. & Pain, S. 2001. Potential use of multixenobiotic defense mechanism (MXDM) in *Dreissena polymorpha* as a biomarker for the monitoring of freshwater pollution. *Water Research*. 35(15): 3743-3748.

Paz, B., Riobó, P., Fernández, M.L., Fraga, S., Franco, J.M., 2004. Production and release of yessotoxins by the dinoflagellates *Protoceratium reticulatum* and *Lingulodinium polyedrum* in culture. *Toxicon*. 44: 251-258.

Pearson, W. R. & Lipman, D. J. 1988. Improved Tools for Biological Sequence Comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 85: 2444-2448.

Pérez Camacho, A. 1992. Cultivo do mexillón na batea. Tema 12. Xunta. Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura. 48 pp.

7. Bibliografía

Peteiro, L.G., Filgueira, L., Ayala, A., Fernández-Reiriz, M.J. 2007. Unidades didácticas de acuicultura. Fundación OESA. <http://www.fundacionoesa.es/publicaciones?gid=7&task=group>

Pfaffl, M.W. 2004. Quantification Strategies in Real-Time PCR. En: A-Z of Quantitative PCR. S.A.Bustin, ed. International University Line. La Jolla. 87-120.

Pfaffl M.W., Horgan G.W. & Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 30(9): 1-10.

Pfaffl, M., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Bestkeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*. 26: 509-515.

Poli, M.A., Mende, T.J., Gaden, D.G. 1986. Brevetoxins, unique activators of voltage-sensitive sodium channels bind to specific sites in rat brain synaptosomes. *Molecular Pharmacology*. 30: 129-135.

Promega Corporation. Extraído de: <http://www.promega.com/default.asp>

Puinean, A.M., Labadie, P., Hill, E.M., Osada, M., Kishida, M., Nakao, R., Novillo, A., Callard, I.P., Rotchell, J.M. 2006. Laboratory exposure to 17-beta estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate, *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*. 79: 376-383.

Regueiro, J., Rossignoli, A.E., Alvarez, G., Blanco, J. 2011. Automated on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for determination of lipophilic marine toxins in shellfish. *Food Chemistry*. 129 (2): 533-540.

7. Bibliografía

Riisgård, H.U. & Larsen, P.S. 2001. Ciliary filter feeding and biofluid mechanics - present understanding and unsolved problems. *Limnology and Oceanography*. 46: 882-891.

Ritz, V., Marwitz, J., Sieder, S., Ziemann C., Hirsch-Ernst, K.I., Quentin, I., Steinfelder, H. J. 1999. Contribution of *mdr1b*-type P-glycoprotein to okadaic acid resistance in rat pituitary GH3 cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 360(2): 116-121.

Rosenberg, M.F., Callaghan, R., Ford, R.C., Higgins, C.F. 1997. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *Journal of Chemical Biology*. 272: 10685-10694.

Ruiz, M., Tarifeño, E., Llanos-Rivera, A., Padget, Ch., Campos, B. 2008. Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y larval del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Revista de biología marina y oceanografía*. 43, n. 1: 51-61.

Sampayo, M.E., Alvito, P., Franca, S., Sousa, I. 1990. *Dinophysis* spp. toxicity and relation to accompanying species. En: *Toxic Marine Phytoplankton*. Graneli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D.M. Eds. Elsevier. 215-220.

Sanjuan, A., Zapata, C., & Alvarez, G. 1994. *Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis* on the coasts of the Iberian Peninsula. *Marine ecology progress series*. 113: 131-146.

Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G., Varadi, A. 2006. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinmunity defense system. *Physiological Reviews*. 86: 1179-1236.

Saurin, W., Hofnung, M., Dassa, E. 1999. Getting In or Out: Early Segregation Between Importers and Exporters in the Evolution of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. *Journal of Molecular Evolution*. 48: 22-41.

7. Bibliografía

Schröder, H.C., Badria, F.A., Ayyad, S.N., Batel, R., Wiens, M., Hassanein, H.M.A., Kurelec, N., Müller, W.E.G. 1998. Inhibitory effects of toxin from the marine algae *Caulerpa taxifolia* and *Caulerpa racemosa* on multixenobiotic resistance in the marine sponge *Geodia cydonium*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 5 : 119-126.

Sellars, M.J., Vuocolo, T., Leeton, A.L., Comana, J.G., Degnan, M.B., Preston, N.P. 2007. Real-time RT-PCR quantification of Kuruma shrimp transcripts: a comparison of relative and absolute quantification procedures. *Journal of Biotechnology*. 129: 391-399.

Selvey, S., Thompson, E.W., Matthaei, K., Lea, R.A., Irving, M.G., Griffiths, L.R. 2001. Beta-actin- an unsuitable internal control for RTPCR. *Molecular and Cellular Probes*. 15: 307-311.

Shyamala, V., Baichwal, V., Beall, E. & Ames, G.F. 1991. Structure–function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *Journal of Biological Chemistry*. 266: 18714-18719.

Siah, A., Dohoo, C., McKenna, P., Delaporte, M., Berthe, F.C. 2008. Selecting a set of housekeeping genes for quantitative real-time PCR in normal and tetraploid haemocytes of soft-shell clams, *Mya arenaria*. *Fish and Shellfish Immunology*. 25: 202-207.

Smital, T., Sauerborn, R., Pivcevic, B., Krca, S., Kurelec, B. 2000. Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. *Comparative Physiology and Biochemistry*. 126C: 175-186.

Smital, T., Sauerborn, R. & Hackenberger, B.K. 2003. Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology*. 65: 443-465.

7. Bibliografía

Spinsanti, G., Panti, C., Lazzeri, E., Marsili, L., Casini, S., Frati, F., Fossi, C.M. 2006. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) skin biopsies. *BMC Molecular Biology*. 7: 32.

Subba Rao, D.V., Quilliam, M.A., Pocklington, R. 1988. Domoic acid - A neurotoxic amino acid produced by the marine diatom *Nitzschia pungens* in culture. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45: 2076-2079.

Suzuki, T., Igarashi, T., Ichimi, K., Watai, M., Suzuki, M., Ogiso, E., Yasumoto, T. 2005. Kinetics of diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid, dinophysistoxin-1, pectenotoxin-6 and yessotoxin in scallops *Patinopecten yessoensis*. *Fisheries Science*. 71: 948-955.

Svensson, S. 2003a. Effects, dynamics and management of okadaic acid in blue mussels, *Mytilus edulis*. PhD thesis. Göteborg University. 50 + I-VI pp.

Svensson, S. 2003b. Depuration of okadaic acid (diarrhetic shellfish toxin) in mussels, *Mytilus edulis* (Linnaeus), feeding on different quantities of nontoxic algae. *Aquaculture*. 218 (1-4): 277-291.

Svensson, S. & Förlin, L., 2004. Analysis of the importance of lipid breakdown for elimination of okadaic acid (diarrhetic shellfish toxin) in mussels, *Mytilus edulis*: results from a field study and a laboratory experiment. *Aquatic Toxicology*. 66 (4), 405-418.

Taniyama, S., Arakawa, O., Terada, M., Nishio, S., Takatani, T., Mahmud, Y., Noguchi, T. 2003. *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon*. 42: 29-33.

Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*. 75: 291-295.

7. Bibliografía

- Thompson, R.J. & Bayne, B.L. 1974. Some relationships between growth, metabolism and food in the mussel, *Mytilus edulis*. *Marine Biology*. 27: 317-326.
- Tillmann, U., Elbrächter, M., Krock, B., John, U., Cembella, A. 2009. *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (Dinophyceae) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *European Journal of Phycology*. 44: 63-79.
- Tomblin, G., Bartholomew, L.A., Gimi, K., Tyndall, G.A., Senior, A.E. 2004. Synergy between conserved ABC signature Ser residues in P-glycoprotein catalysis. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 5363-5373.
- Toomey, B.H. & Epel, D. 1993. Multixenobiotic resistance in *Urechis caupo* embryos: Protection from environmental toxins. *Biological Bulletin*. 185: 355-364.
- Toomey, B.H., Kaufman, M.R. & Epel, D. 1996. Marine bacteria produce compounds that modulate multixenobiotic transport activity in *Urechis caupo* embryos. *Marine Environmental Research*. 42(1-4): 393-397.
- Tricarico, C., Pinzani, P., Bianchi, S., Paglierani, M., Distante, V., Pazzagli, M., Bustin, S.A., Orlando, C. 2002. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalisation to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry*. 309: 293-300.
- Tutundjian, R. & Minier, C. 2007. Effect of temperature on the expression of P-glycoprotein in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Journal of Thermal Biology*. 32: 171-177.
- Urbatsch, I.L., Julien, M., Carrier, I., Rousseau, M.E., Cayrol, R., Gros, P., Ruyschaert, J.M. 2000. Mutational analysis of conserved residues in the nucleotide binding sites of P glycoprotein. *Biochemistry*. 39: 14138-14149.

7. Bibliografía

Vale, P. & Sampayo, M.A. 1999. Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon*. 37: 1109-1121.

Vale, P. & Sampayo, M.A. 2002. Esterification of DSP toxins by Portuguese bivalves from the Northwest coast determined by LCMS a widespread phenomenon. *Toxicon*. 40: 33-42.

van Dolah F.M. 2000. Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 108 (suppl 1): 133-141.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 3(7): 0034.1-0034.11.

Vela, S., & Ojeda, J. APROMAR. 2007. Acuicultura: La revolución azul. Publicaciones Científicas y Tecnológicas del Observatorio Español de Acuicultura, disponible en http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Revolucion_azul/revolucion_azul.pdf

Vierstraete, A. 2001. Principle of the PCR. <http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html>

Waldmann, P., Pivcevic, B., Muller, W.E., Zahn, R.K., Kurelec, B. 1995. Increased genotoxicity of acetylaminofluorene by modulators of multixenobiotic resistance mechanism: studies with the fresh water clam *Corbicula fluminea*. *Mutation Research*. 342: 113-123.

Walker, N.J. 2002. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science*. 296: 557-559.

Wan, Q., Whang, I., Choi, C.Y., Lee, J.S., Lee, J. 2011. Validation of housekeeping genes as internal controls for studying biomarkers of endocrine-disrupting

7. Bibliografía

chemicals in disk abalone by real-time PCR. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*. 153: 259-268.

Ward, J.E., Sanford, L.P., Newell, R.I.E., MacDonald, B.A. 1998. A new explanation of particle capture in suspension-feeding bivalve molluscs. *Limnology and Oceanography*. 43: 741-752.

WHOI (Woods Hole Oceanographic Institution) 2008. <http://www.whoi.edu/redtide/page.do?pid=14899&tid=542&cid=65844&c=3>

Widdows, J. & Donkin, P. 1992. Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. En: *The Mussel 'Mytilus': Ecology, Physiology, Genetics, and Culture*. Gosling, E. Ed. Elsevier. 383-424.

Winter, J.E., Langton, R.W. 1976. Feeding experiments with *Mytilus edulis* L. at small laboratory scale. The influence of the total amount of food ingested and food concentration on growth. En: *Proceedings of the 10th European Symposium on Marine Biology*. Persoone, G. & Jaspers, E. Eds. Universa Press. 565-581.

Wright, J.L.C., Boyd, R.K., de Freitas, A.S.W., Falk, M., Foxall, R.A., Jamieson, W.D., Laycock, M.V., McCulloch, A.W., McInnes, A.G., Odense, P., Pathak, V., Quilliam, M.A., Ragan, M.A., Sim, P.G., Thibault, P., Walter, J.A., Gilgan, M., Richard, D.J.A., Dewar, D. 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from Eastern Prince Edward Island. *Canadian Journal of Chemistry*. 67: 481-490.

Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G., Clardy, J. 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*. 41: 1019-1025.

Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M. 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bulletin of Japanese Society Sciences Fisheries*. 44: 1249-1255.

7. Bibliografía

Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T., Fujita, N. 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 46: 1405-1411.

Zaja, R., Klobucar, G.I.V., Klobucar, R.S., Hackenberger, B.K., Smital, T. 2006. Haemolymph as compartment for efficient and non-destructive determination of P-glycoprotein (Pgp) mediated MXR activity in bivalves. Comparative Physiology and Biochemistry C. 143: 103-112.

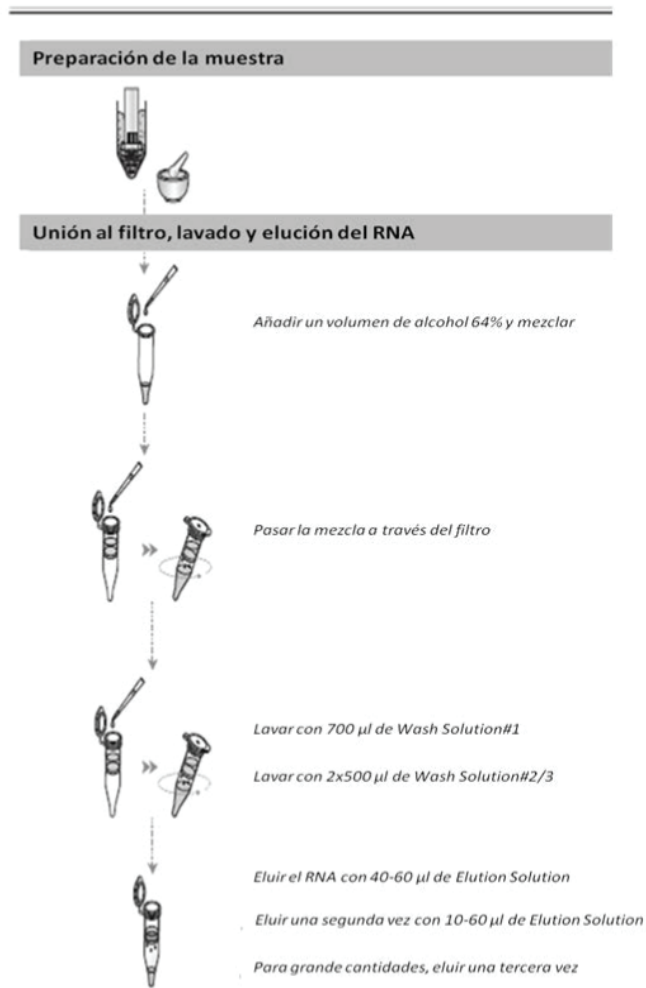
Zhang, Z. & Hu, J. 2007. Development and validation of endogenous reference genes for expression profiling of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to endocrine disrupting chemicals by quantitative real-time RT-PCR. Toxicological Sciences. 95(2): 3563-3568.

Zhao, S. & Fernald, R.D. 2005. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. Journal of Computational Biology. 12(8): 1045-1062.

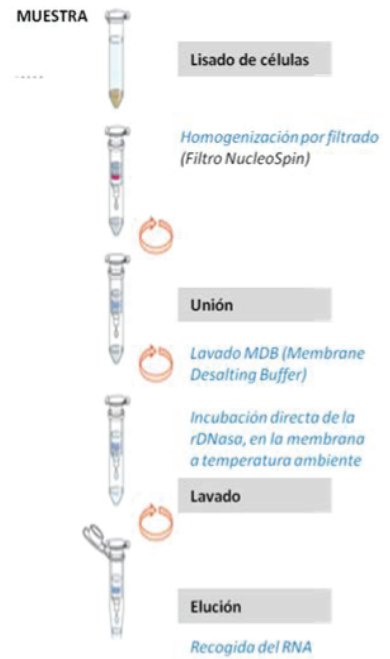
8. ANEXO

8.1. Esquemas de los protocolos

RNAqueous® Kit



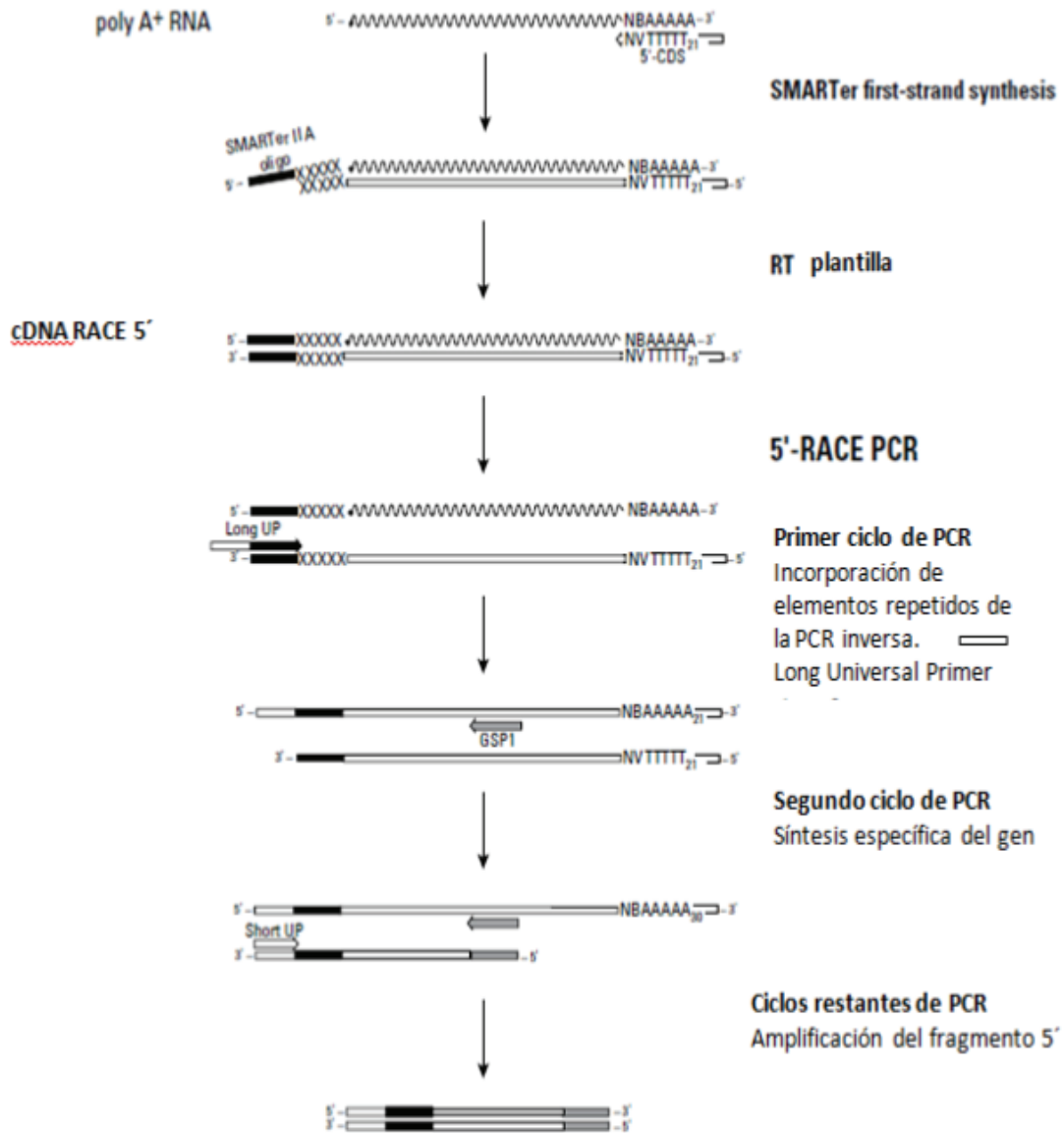
NucleoSpin RNAII



8. Anexo

8.1. Esquemas de los protocolos (cont.)

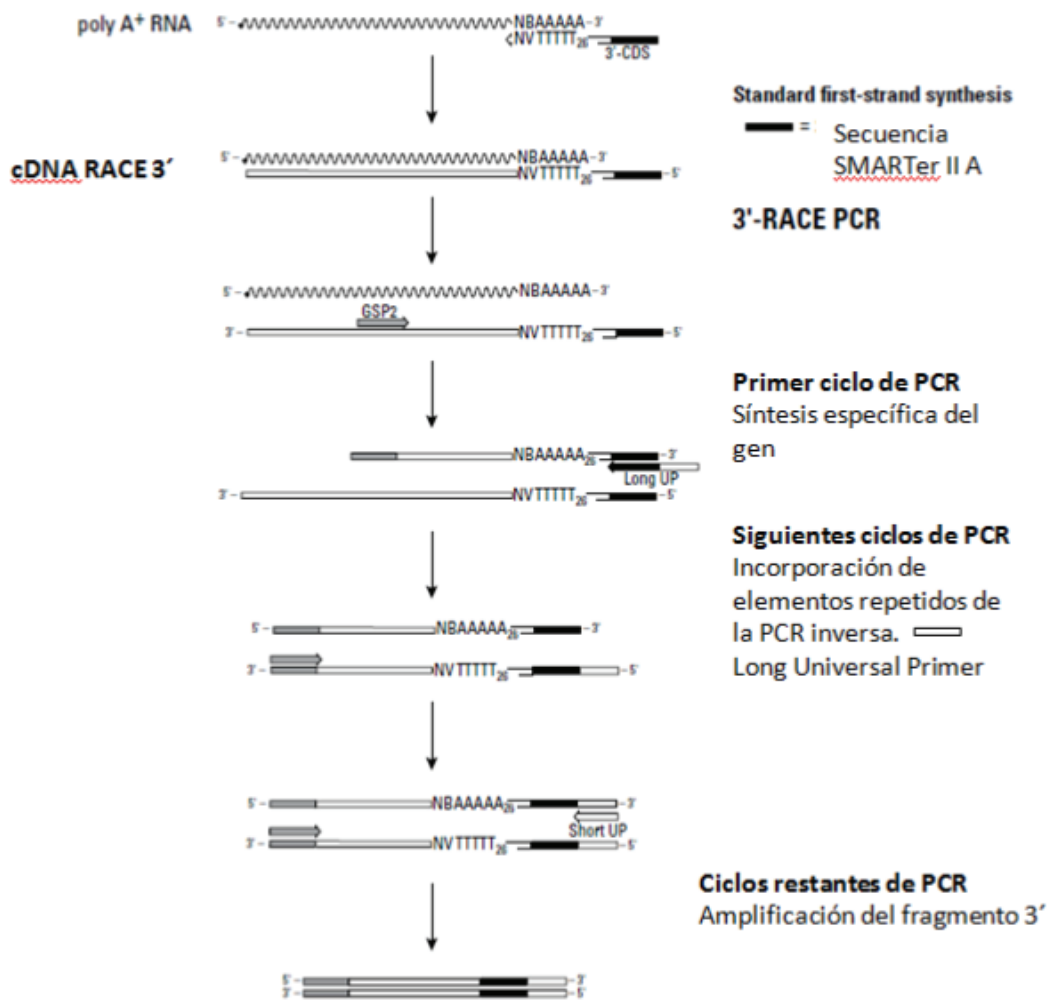
Mecanismo detallado de la reacción de RACE 5'



Fragmento de doble cadena de RACE 5'

8. Anexo

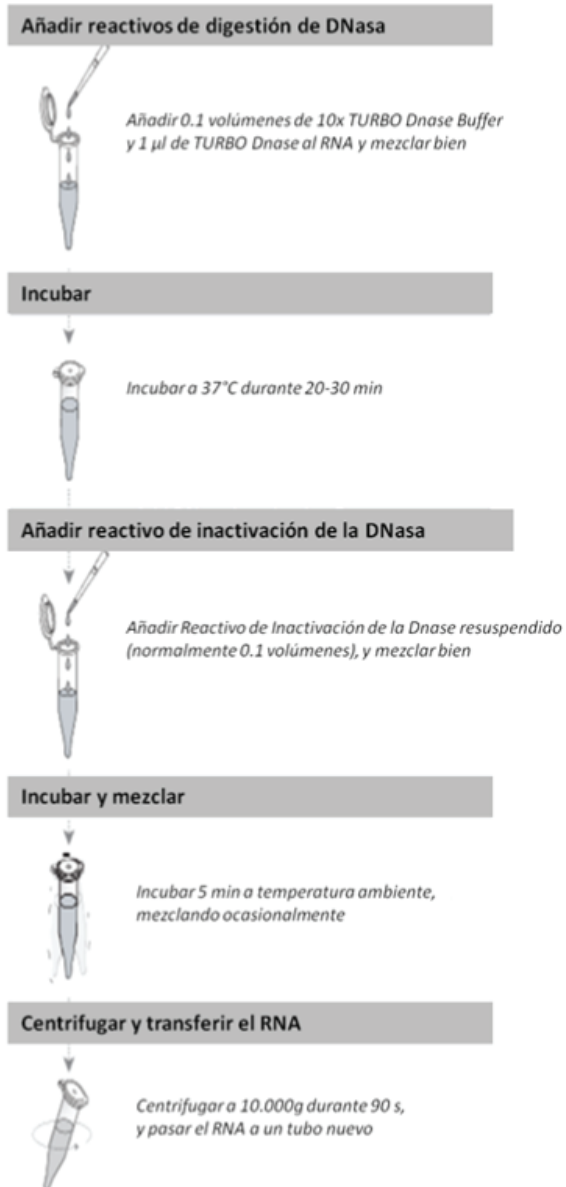
Mecanismo detallado de la reacción de RACE 3'



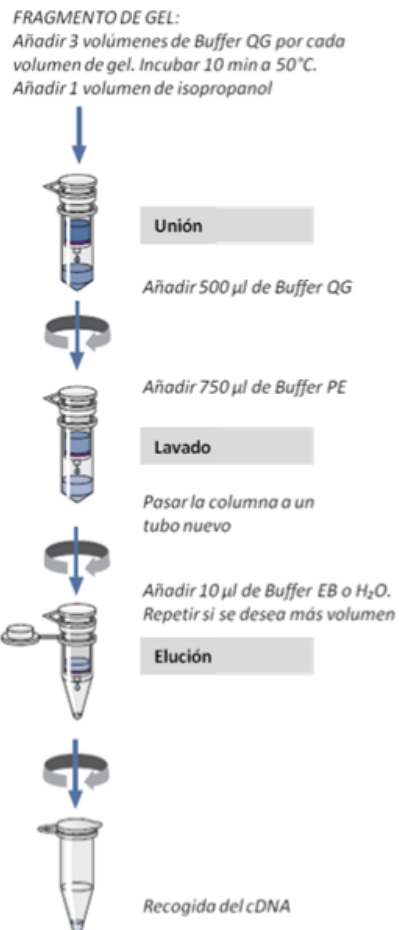
8. Anexo

8.1. Esquemas de los protocolos (cont.)

TURBO DNA-free

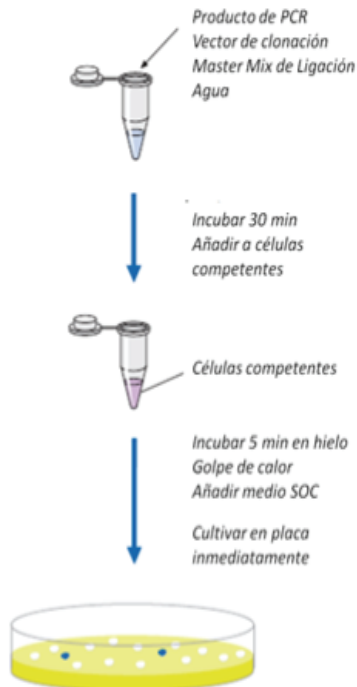


MinElute Gel Extraction



8. Anexo

QIAGEN PCR Cloning Kit Procedimiento



MinElute Gel Extraction

Lisado de bacterias

- Concentrar bacterias por centrifugación.
- Resuspender en 200 μ l de Solución de Resuspensión
- Añadir 200 μ l de Solución de lisis. Dejarlo actuar durante \leq 5 min

Preparación del lisado

- Añadir 350 μ l de Solución de neutralización. Girarlo para mezclar de 4-6 veces
- Centrifugación a máxima velocidad, para concentrar los restos

Preparar las columnas de unión

- Añadir 500 μ l de Solución de preparación de la columna, a la columna de unión
- Centrifugar y descartar el líquido

Unión del plásmido de DNA a las columnas

- Transferir el lisado a la columna
- Centrifugar y descartar el líquido

Lavado para eliminar los contaminantes

- Añadir 750 μ l de Solución de lavado y centrifugar.
- Una vez descartado el líquido, se realiza una nueva centrifugación para secar la columna

Elución del plásmido purificado

- Pasar la columna a un nuevo tubo colector
- Añadir 50 μ l de Solución de elución y centrifugar
- Repetir si se desea más volumen.

Plásmido de DNA



8. Anexo

8.2. Alineamiento de secuencias

Alineamiento con ClustalW y modificado con el programa GeneDoc2.7.0. de las secuencias de los genes *mdr* de mejillón *M. galloprovincialis* (Mg), con otras del mejillón *M. californianus* (Mc), de la ostra *C. gigas* (Cg), y de humano *H. sapiens* (h).

```

*          20          *          40          *          60          *          80
MgMdr2      : MPEPELLGYKPTATEGNGLQONGANGIPDPDIDTRPASTADPKVNFKNGRVSPDKSDKDEKDKD---KPKKEPEK : 77
Cg_gi|4059  : -----MFYTPCTDNAESELP--LENGSPR-KEGILPASLPIDKKDLENGTDMANGKVVDEENKSTFDGEKEEKKEEQK : 72
hABCb1/MDR  : -----MDLEGRNNGGAKK----KNFFKLNNKSEKDKKEK--P : 32
hABCb4/MDR  : -----MDLEAAKNGTAWRPTSAEGDFELGISKQKRRKTKTVK : 38
Ca_AET3445  : ---MEKQNTTLTAKDIEMDEKIPSONGEYVHQNGEN-GKQNGVTENRVAEPKKGQATVTTINPEVEVKTVKDKKQKEKQV : 76
MgMdr1      : -----MSKSEERKPLLGDASDEQESYTDKDKKDKKDKKPKDGGP : 39
McABS83556  : -----MSESEERKPLLADASDEQESYTDKDKTKDEEKKPEGPP : 39
Cg|4059700  : -----MSDTERAPLLS--SEKGEKYSEKKTNE---KKQKSAK : 33

*          100         *          120         *          140         *          160
MgMdr2      : MVGFFEVFKFSICVDKLLMIFGSLFALAHGAALPAMIIVFGDMIDLFVESG-----MFEQFLNDIRSYLPTLGTYDQ : 150
Cg_gi|4059  : MVGPLEIFKYGICFDYFLMVFVGSFCAVCHGAALPSMITVFGDMINTFVNSG-----IYNNWLLSISAYLATVSIITIAQ : 145
hABCb1/MDR  : TVSVFMSFRYSNWLKRLYMVVGCTIAAILHAGAGLPMHVVFGEMTDIFANAG-----NLEDLYSNITN-----R : 95
hABCb4/MDR  : MIGVLTLLFRYSQDWQDKLWMSLCTIMAIHAGSGLPMMIVFGEMTDKFDVDTA-----GNFSFPVNFV-----LT : 100
Ca_AET3445  : HIGFFTLFRYGMFDKTIILAVGTLICAMGTGCATPINFFVYGDLANYPIMYD-----IAKGTNFSDTN-----L : 140
MgMdr1      : PATLGLFRYATCVDTICLLFGLSFLAHAGAGWVLSIVVMCOMTDTFVAGP-----NGSLTPDP-----N : 100
McABS83556  : PATLGLFRYATSVDTICLLFGLSFLAHAGAGWVLSIVVMCOMTDTFVAGP-----NGSLTPDP-----N : 100
Cg|4059700  : SATFGGLFRYATLADKFLIFLIGSVFAIIVGGWPAISVIFGELIDTFVSGPGGFTFCVNGSLVNLNGTG-----N : 103

*          180         *          200         *          220         *          240
MgMdr2      : VYDNPPLLNNN--RTAIAQALNYTIDWKWLE--VQDELLDQMKTFALYYIATAGGVVVCGYVOVSPWAVVAERQAHRIID : 226
Cg_gi|4059  : AVSDPAILLNNTHTRALQASPNVNTDFSAKDVAESEDLEETMKVVEVYIIGIGGGVLFVGYLQACWATAAERQTHRIIRI : 225
hABCb1/MDR  : SDINDTG-----FFMNLLEDMDTRYAYYSYSGIAGVLAAYIOVSPWCLAAGRQTHKIRK : 149
hABCb4/MDR  : SLLNPG-----KILEEBMTRYAYYSYSGIAGVLAAYIOVSPWTLAAGRQIRKIRQ : 151
Ca_AET3445  : TLVNREELLKS-----LDLIDAKEHALYFCLTAICAFTLTFTSIFQFTVSAERQIRVIRK : 196
MgMdr1      : ATHN-PNVTE-----SFDKMTTYALYYLIIGGVLLSYLQIACFMTACERQVNKIRK : 154
McABS83556  : ATFN-PNATTE-----SFDKMTTYALYYLIIGGAVLFSYLOIACFMTACERQVNKIRK : 154
Cg|4059700  : TTGNDSSAAD-----EFEDKMTYARYYLYIAAVLVVAGSYLOIMCWTACERQHTIRK : 158

*          260         *          280         *          300         *          320
MgMdr2      : MFLRNVLROEIGWFDLTHEGELNTRLSDDINKIHEGIDKMGSCLOVTSGLTGFHIGFYGKLLTLVILATSPLLAVTG : 306
Cg_gi|4059  : AFERNMROEIGWFDLTHSGELNTRLTCDVNKIQMGIADKMGIFFOQMSSFIVGVLIIGFYGKLLTLVILAFGLIMIAA : 305
hABCb1/MDR  : QFHAIMROEIGWFDVHDVGEINTRLTDDVSKINEGIDKMGFMFFQSMATFFFTGFTVGFTRGKLLTLVILATSPVGLSA : 229
hABCb4/MDR  : KFHALROEIGWFDLINDITELNTRLTDDISKISEGIDKMGFMFFQAVATFEAGFLVGFTRGKLLTLVIMATSPILGLSA : 231
Ca_AET3445  : LFRSRMRODMWFDTHESEELSTRFSDDMHLYIDGMGDVATFQITITFVVSFVIAFISCKKLLATVAFGLIILIG : 276
MgMdr1      : QFQALLROEIGWFDKHSSELNTRLSDDLEFVREGEIDKLSLLIQEVAQFFAFAIFGYKSNMMLVMMSLTPLLAJLG : 234
McABS83556  : HFRRALROEIGWFDKHSSELNTRLSDDLEFVREGEIDKLSLLIQEVAQFFAFAIFGWKSNMMLVMMSLTPVLAJLA : 234
Cg|4059700  : VFRSRVROEIGWFDKNSGELTTRLDINKIKDGLDKFSFTFQVTAQFESGFALGFNKSNMMLVMMSVTPILAVSA : 238

*          340         *          360         *          380         *          400
MgMdr2      : FVMNKLVADMSSKSESEAYAKAGAIABEVFSSIRTVVVSFGGQOKECQRYNSHLQAKDVGIKKGYTNGFSVGLVYVVMFGA : 386
Cg_gi|4059  : LIQDKMISTASSKGLDAYAKAGAVADEVIGAIRTVVAHGGQDKCEERYSKHLINDAKGSGIKKGLTVGFMSGIIYFVFSV : 385
hABCb1/MDR  : AVWAKLSSFTDKELLAYAKAGAVAEVLAARTVVAHGGQKELERYKNLEAKRIGIKKAITANTSIGAFLLIYAS : 309
hABCb4/MDR  : AVWAKLSAFSDKELAAAYAKAGAVAEALGAI RTVVAHGGQNKELERYQKHLNNAKIGIKKAITANSIGIAFLLIYAS : 311
Ca_AET3445  : GTLTRVWRNLSGEESSQAYASAGSVAEVEFSAIRTVVAHNGQEKCKRYNANLHAKNNAAKKGVVLGLVSAWVFLVFAA : 356
MgMdr1      : GYFSGMLQNEAKREQALYADAGSVAEVEVISCMTVVSFNGQKQEVKRYGKSLLETKOIGIKKSMVTDLLGSLYLVVMFGD : 314
McABS83556  : AYFSSMLQNEAKREQALYADAGSVAEVEVISCMTVVSFNGQKQEVKRYGKSLLETKOIGIKKSMVTDLLGSLYLVVMFGD : 314
Cg|4059700  : AIMSVMIRNYTKKEQESYACAGSVAEVEVLSCTRTVVSFNGQROBOIRYESALKETTRIGIRKSFVQGVMLGLIMFMFGT : 318

*          420         *          440         *          460         *          480
MgMdr2      : YALGFWYGAKLVRREESD-----TYTICKVLIIFSVLIGANSIGNVAFPLQLSASARGAAEFVFDIITKLVPEIDSYG : 458
Cg_gi|4059  : YGFGFWYGAKMVRED-D-----DYNPGNVLTVFSSIMIAAHSLSYATPPLGKSEARGAAEFVYKMTDSVPDIDSAS : 456
hABCb1/MDR  : YALAFWYGTTLVLSG-----EYSIGQVLTVFS-VLIGAFSVQASESLFAFANARGAAYETFKLIDNKPSIDSYG : 378
hABCb4/MDR  : YALAFWYGSTLVISK-----EYTIIGNAMTVFSSILIGAFSVQAAAFCLDAFANARGAAYVIFDIIDNNPKIDSEFS : 381
Ca_AET3445  : LSVAFYVYGVKIMQDPDE-----DFDPGDTLTVFLGVMI GMSLGHAFETLEVIANARGAATKVFSLIEQKSKINYEQ : 428
MgMdr1      : YATSFWYGNQVKKPITSNGED---GITPCTVLTVFFGVMI GMSFSGNNAFNTGSEVTAAGAAAVVYELIDRPFKIDASS : 391
McABS83556  : YATSFWYGNQVKEYITSNGAE---GITPCTVLTVFFGVMI GMSFSGNNAFNTGSEVTAAGAAAVVYELIDRPFKIDASS : 391
Cg|4059700  : YATAFWYGSQVQKDWYHSYCAEREGISPEGVLTVFFGVMI GMSFSGNNAFNTGSEVTAAGAAAVVYELIDRPFKIDASS : 398

```

8. Anexo

```

*           *           *           *           *
MgMdr2      : EEESKPDKVTGNIQFRNVKFTYPAKKEVQVVKGVLDLWQGGQTVALVGS SGGCKSTIIVLQRMRYVDFEGGTTLDGNLTK : 538
Cg_gi|4059  : DECLKPKEMLGSVFLRNVRFRYPARPEVEVLKGVSLRINRGETVALVGS SGGCKSTIIVLQRMRYVDFEGGTTLDGNLTK : 536
hABCb1/MDR : KSGHKPDNIRKGNLEFRNVHFSYPSRKEVKILKGLNLRKQVSGQTVALVGS SGGCKSTIIVLQRMRYVDFEGGTTLDGNLTK : 458
hABCb4/MDR : ERGHKPDSTIKGNLEFRNVHFSYPSRANVKILKGLNLRKQVSGQTVALVGS SGGCKSTIIVLQRMRYVDFEGGTTLDGNLTK : 461
Ca_AET3445  : EGGKLEKMBGNITFRGVHFRYPARENPILOSIDFVQKSGQTVALVGS SGGCKSTIIVLQRMRYVDFEGGTTLDGNLTK : 508
MgMdr1      : EKGRPLSTIQGALQFLGVNFTYPTREDVQVLTNENLSTKPKGQTVALVGS SGGCKSTIIVLQRMRYVDFEGGTTLDGNLTK : 471
McABS83556  : EKGRPLSTIQGALQFLGVNFTYPTREDVQVLTNENLSTKPKGQTVALVGS SGGCKSTIIVLQRMRYVDFEGGTTLDGNLTK : 471
Cg|4059700  : EKGEVVSLLDGDIDFVGVHFSYPTREEVKVLKRNENLNRGRQTVALVGS SGGCKSTIIVLQRMRYVDFEGGTTLDGNLTK : 478

*           *           *           *           *
MgMdr2      : DLNWKWLRREHIGIVSQEPVLFAMSTKDNIRMGRRNVVDDDEVIAATKMANAYNFIMDLPEKFTLTVGERGAQLSGGQKQRI : 618
Cg_gi|4059  : SLNWKWLRREHIGIVSQEPVLFATTTAENIRMGKEDVDSEEMIAACKMANAHDFIETLNLKYEFTLTVGERGAQLSGGQKQRI : 616
hABCb1/MDR : TINVRFRLREHIGIVSQEPVLFATTTAENIRYGRNVTMDETEKAVKEANAYDFIMKLPKHFDTLTVGERGAQLSGGQKQRI : 538
hABCb4/MDR : NFNWLRREHIGIVSQEPVLFATTTAENIRYGRNVTMDETEKAVKEANAYDFIMKLPKHFDTLTVGERGAQLSGGQKQRI : 541
Ca_AET3445  : ENNITWLRREHIGIVSQEPVLFATTTAENIRYGRNVTMDETEKAVKEANAYDFIMKLPKHFDTLTVGERGAQLSGGQKQRI : 588
MgMdr1      : DLNWLRLRREHIGIVSQEPVLFATTTAENIRMGRRNVVDDDEVIAATKMANAYNFIMDLPEKFTLTVGERGAQLSGGQKQRI : 551
McABS83556  : DLNWLRLRREHIGIVSQEPVLFATTTAENIRMGRRNVVDDDEVIAATKMANAYNFIMDLPEKFTLTVGERGAQLSGGQKQRI : 551
Cg|4059700  : ELNFWLRRLRREHIGIVSQEPVLFATTTAENIRMGRRNVVDDDEVIAATKMANAYNFIMDLPEKFTLTVGERGAQLSGGQKQRI : 558

*           *           *           *           *
MgMdr2      : AIARALVRDPKILLLDEATSALDTESESTVQVEALDKANAGRTTLVIAHRLSTIKNADITAGFKEGVIIEQETHDOLMAKS : 698
Cg_gi|4059  : AIARALVKDPKILLLDEATSALDTESESVQVEALDKASAGRTTIVVAHRLSTIKTANKTAGFVSGELREMGTHDOLMOKG : 696
hABCb1/MDR : AIARALVRNPKILLLDEATSALDTESEAVQVVALDKAKGRRTTIVIAHRLSTVRNADVIAGFDDGVIIEKGNHDLMEKKE : 618
hABCb4/MDR : AIARALVRNPKILLLDEATSALDTESEAVQVVALDKAKGRRTTIVIAHRLSTVRNADVIAGFDDGVIIEKGNHDLMEKKE : 621
Ca_AET3445  : AIARALVRNPKILLLDEATSALDTESEAVQVVALDKAKGRRTTIVIAHRLSTVRNADVIAGFDDGVIIEKGNHDLMEKKE : 668
MgMdr1      : AIARALVRNPKILLLDEATSALDTESEAVQVVALDKAKGRRTTIVIAHRLSTVRNADVIAGFDDGVIIEKGNHDLMEKKE : 631
McABS83556  : AIARALVRNPKILLLDEATSALDTESEAVQVVALDKAKGRRTTIVIAHRLSTVRNADVIAGFDDGVIIEKGNHDLMEKKE : 631
Cg|4059700  : AIARALVRNPKILLLDEATSALDTESEAVQVVALDKAKGRRTTIVIAHRLSTVRNADVIAGFDDGVIIEKGNHDLMEKKE : 638

*           *           *           *           *
MgMdr2      : GVNLSLWTLQTKKVD-----VEVEAEEELIKEYTEGIKDTDKKKLHRGMSTLSDGKSAAEKQ : 757
Cg_gi|4059  : GVIATLTKNOT-----VDEEEELIAEFVQ--ISKETTLEK-----GGHAPGWKKL : 741
hABCb1/MDR : GIYFKLITMOTAGNT-----VELNAADESKSEIDALEMSSNDSRSLSLRK-----RSTRR : 669
hABCb4/MDR : GVIYFKLITMOTAGNT-----IQSE--EFELENDEKAATRMAMPNGWKSRLFR-----HSTQK : 669
Ca_AET3445  : GLIYTLVNDOSQINE-----ETEEVAEELEHELFEEEEPEDEHAVLMQVKGHNATPIARQMSAM : 727
MgMdr1      : GLIYHSLVTAQTLVNE DAGFQNECEDAEALALDEDEEEEAADAVPDQTVKQRSRIRKSTSSDDKSPQKLS-----RQLSRQ : 705
McABS83556  : GLIYHSLVTAQTLVNE DAGFQNECEDAEALALDEDEEEEAADAVPDQTVKQRSRIRKSTSSDDKSPQKLSR--QMSRQLSRQ : 709
Cg|4059700  : EFYQLVQAQSLPDDNGAN-----GDDNKAHYKQRQSRVSSSSDKSDNLRKQT-----SRQVSIIT : 695

*           *           *           *           *
MgMdr2      : ESVTDKKKKKGKKGEEEEKKPKPDVGTGRIIRYNAPEWPIYTLVGCIAACINCGVQPAFAVIFAEILIG-VEAEQDP-DKQ : 835
Cg_gi|4059  : PAKENETKEDDDKDKKDEKKEEAEAGGRIMKMNAPWPIYLLGSLGAIMNGGVQPAFAIIFSEILG-TEAITST-SEQ : 819
hABCb1/MDR : SVRGSQAQDEKLSLK-EALDESIPPVSEWRIMKLNLEPWPIYFVGVFCALINGGLQPAFAIIFSKHIG-VFTRIDDPETK : 747
hABCb4/MDR : NLKNSQMCSQLSDVETDGLLEANVPPVSLKVLKLNKTEWPIYFVGVFCALINGGLQPAFAIIFSEILG-TEAITST-SEQ : 747
Ca_AET3445  : SSSNDVIVDSKAETDEEEVEADIPLALPGKMKMKNSEWPIYTLVGCIAACINCGVQPAFAIIFSEILG-TEAITST-SEQ : 804
MgMdr1      : TSGLSDGKDAEKEEPEEPEEYEPPIYFRMIBHQNEPECGFIVLGIWASCVAGCTMPAFAIFFGEMIK-VEIELG----- : 779
McABS83556  : MSGQPDGKDAEKEEPEEPEEYEPPIYFRMIBHQNEPECGFIVLGIWASCVAGCTMPAFAIFFGEMIK-VEIELG----- : 783
Cg|4059700  : EKGISKEEAEKEE-----EEEEVEKPKYFRILRNENFPECPLIFGLFAALQCTMPFAVFEFGEMIKVVDIYDI----- : 767

*           *           *           *           *
MgMdr2      : EKEVLMYCLILGIGVAGFIFGFLQAMFGRSGENLFRMRKNTFRAMIRQDTSWYDDHKNSGTALTRRLAVDASQVQGA : 915
Cg_gi|4059  : EDKMLMWTLLMVGIGVISFLTELTOGYCFVSGBNLFRMRKNTFRAMIRQDTSWYDDHKNSGTALTRRLAVDASQVQGA : 899
hABCb1/MDR : RQNSLFSLELALGLIISFIFTELQGFTECKAGEILFKRLRYMVFRLRQDMSWFDDPKNTTGALTRRLAVDASQVQGA : 827
hABCb4/MDR : QQKCNIFSLIFLFLGLIISFIFTELQGFTECKAGEILFKRLRSMAFKAMLRQDMSWFDDPKNTTGALTRRLAVDASQVQGA : 827
Ca_AET3445  : DRSVSLVLCIIMGIAVFNALLRLHLGICFVKAGSDLLFRMRKLAFLSIVWQDLSFFDNHENRVGALTRRLAVDASQVQGA : 884
MgMdr1      : NNG-LLWSMMELALGGINFLVYVQASSFCISGBRLQRLRGLTFNAYMRQDIAFFDDKFHSTGALTRRLAVDASQVQGA : 858
McABS83556  : NNG-LLWSMMELALGGINFLVYVQASSFCISGBRLQRLRGLTFNAYMRQDIAFFDDKFHSTGALTRRLAVDASQVQGA : 862
Cg|4059700  : NTDNVFWSMMELALGGINFLVYVQASSFCISGBRLQRLRGLTFNAYMRQDIAFFDDKFHSTGALTRRLAVDASQVQGA : 847

*           *           *           *           *
MgMdr2      : ACARLESIVGNINAMGTALVISEFYGWQLTLVILAFIPLFAVGGALQMKIINAVAGQNKEALEEAGKLTATEGVENIRTVV : 995
Cg_gi|4059  : SGACLESIVGNINAMGTALVISEFYGWQLTLVILAFIPLIAGIAGVLMQVLEGVSGQNKEALEEAGKLTATEGVENIRTVV : 979
hABCb1/MDR : IGSRLAVITGNANLCTGLIISFYGWQLTLVILAVPIIATAAGVEMKMLSGQALKDKKLEAGKLTATEGVENIRTVV : 907
hABCb4/MDR : TGTFLALVAGNANLCTGLIISFYGWQLTLVILAVPIIATAAGVEMKMLLAGNAKRDKKELEAGKLTATEGVENIRTVV : 907
Ca_AET3445  : TGTFLAVITGNANLCTGLIISFYGWQLTLVILAVPIIATAAGVEMKMLLAGNAKRDKKELEAGKLTATEGVENIRTVV : 964
MgMdr1      : TGVSIEMVFSVFLVAALVIAFYVQWALAVVIGIVPIIFGASSLQIKVLRHEEDKGLLEAGKLTATEGVENIRTVV : 938
McABS83556  : TGVRIEMVFSVFLVAALVIAFYVQWALAVVIGIVPIIFGASSLQIKVLRHEEDKGLLEAGKLTATEGVENIRTVV : 942
Cg|4059700  : TGFRIETILSSVFLVAALVIAFYVQWALAVVIGIVPIIFGASSLQIKVLRHEEDKGLLEAGKLTATEGVENIRTVV : 927

```

8. Anexo

	*	1060	*	1080	*	1100	*	1120																																																																			
MgMdr2	:	SLIRE	DRI	HDI	Y	LES	R	GE	Y	K	A	A	L	K	K	A	H	V	A	C	F	A	F	S	F	S	Q	S	V	I	F	F	A	Y	A	G	A	F	F	G	A	M	I	K	E	R	E	M	D	F	V	V	F	K	V	F	S	A	I	V	F	G	A	M	A	L									
Cg_gi 4059	:	SLIQE	E	K	L	M	D	M	Y	R	E	O	L	E	P	E	Y	K	T	A	L	K	S	H	L	T	C	T	A	F	A	A	S	T	A	M	F	F	A	Y	A	T	A	F	F	G	A	M	I	K	E	N	E	M	T	Y	T	E	V	F	L	V	F	S	A	I	V	F	G	S	M	A	M		
hABCb1/MDR	:	SLIQE	E	K	L	M	D	M	Y	R	E	O	L	E	P	E	Y	K	T	A	L	K	S	H	L	T	C	T	A	F	A	A	S	T	A	M	F	F	A	Y	A	T	A	F	F	G	A	M	I	K	E	N	E	M	T	Y	T	E	V	F	L	V	F	S	A	I	V	F	G	S	M	A	M		
hABCb4/MDR	:	SLIQE	E	K	L	M	D	M	Y	R	E	O	L	E	P	E	Y	K	T	A	L	K	S	H	L	T	C	T	A	F	A	A	S	T	A	M	F	F	A	Y	A	T	A	F	F	G	A	M	I	K	E	N	E	M	T	Y	T	E	V	F	L	V	F	S	A	I	V	F	G	S	M	A	M		
Ca_AET3445	:	SLIRE	K	T	V	D	E	S	N	H	V	D	S	I	Y	R	S	G	T	R	A	V	L	Y	G	V	V	F	A	V	S	O	C	F	I	Y	F	A	A	S	F	T	Y	G	A	Y	L	V	T	Q	G	L	G	F	Q	D	V	F	R	V	F	G	A	I	L	F	G	G	M	H	V				
MgMdr1	:	SLITE	K	H	F	Y	H	E	Y	H	S	H	L	V	G	E	L	R	S	M	I	K	Q	A	H	W	Y	C	I	A	R	G	L	G	G	V	I	F	M	T	Y	A	G	A	F	R	F	G	A	W	O	V	E	I	G	E	M	T	A	D	N	V	F	K	V	F	A	I	A	F	T	A	M	V	I
McABS83556	:	SLITE	K	H	F	Y	H	E	Y	H	S	H	L	V	G	E	L	R	S	M	I	K	Q	A	H	W	Y	C	I	A	R	G	L	G	G	V	I	F	M	T	Y	A	G	A	F	R	F	G	A	W	O	V	E	I	G	E	M	T	A	D	N	V	F	K	V	F	A	I	A	F	T	A	M	V	I
Cg 4059700	:	SLARE	K	F	Y	D	L	Y	S	E	H	E	S	L	E	S	L	R	S	N	L	K	Q	A	C	L	Y	C	F	A	Y	G	F	S	O	C	V	F	F	A	M	Y	G	A	F	R	F	G	A	W	O	V	S	G	D	M	A	P	E	N	V	K	V	F	A	I	A	F	T	A	M	V	I		
			*	1140	*	1160	*	1180	*	1200																																																																	
MgMdr2	:	GOASA	F	A	P	A	A	K	A	Q	A	S	S	E	V	I	F	P	L	D	T	T	P	I	D	A	E	S	D	K	E	K	P	H	A	E	T	V	T	S	T	V	F	E	R	D	C	K	F	R	Y	P	T	R	P	D	V	E	V	L	Q	G	L	I	L	T	V	D	E	G	Q	T	I		
Cg_gi 4059	:	GESSA	F	A	P	A	A	K	A	K	S	A	S	I	E	K	L	D	R	E	P	K	I	D	P	Y	S	E	E	G	I	K	--	V	D	N	F	T	S	A	V	S	F	R	D	V	H	E	R	Y	P	T	R	P	D	V	E	V	L	Q	G	L	I	L	T	V	D	E	G	Q	T	I			
hABCb1/MDR	:	GOVSS	F	A	P	A	A	K	A	K	S	A	A	H	I	I	M	I	E	K	T	E	L	D	S	Y	S	T	E	G	L	M	--	P	N	T	L	E	G	N	V	T	F	G	E	V	V	F	N	Y	P	T	R	P	D	I	P	V	L	Q	G	L	S	L	E	V	K	K	G	Q	T	I			
hABCb4/MDR	:	GHASS	F	A	P	A	A	K	A	K	S	A	A	H	I	I	M	I	F	E	R	O	P	L	D	S	Y	S	E	E	G	L	--	P	D	K	F	E	G	N	I	F	N	E	V	V	F	N	Y	P	T	R	A	N	V	P	V	L	Q	G	L	S	L	E	V	K	K	G	Q	T	I				
Ca_AET3445	:	GRTGS	N	A	P	D	F	T	K	G	R	A	A	S	R	L	S	L	I	E	R	I	P	T	I	N	A	K	E	D	C	O	K	--	L	K	S	F	T	G	E	V	F	K	D	V	H	S	Y	P	S	R	P	D	V	E	V	L	G	L	S	L	S	V	S	F	G	Q	T	I					
MgMdr1	:	GOSSS	F	A	P	A	A	K	A	K	S	A	A	H	I	I	M	I	K	A	F	D	T	V	S	I	D	I	Y	S	K	R	T	Y	--	L	Q	K	V	D	G	L	T	O	F	K	D	V	N	F	C	Y	P	T	R	E	V	K	V	L	K	G	V	N	K	V	E	P	G	Q	T	I			
McABS83556	:	GOSSS	F	A	P	A	A	K	A	K	S	A	A	H	I	I	M	I	K	A	F	D	T	V	S	I	D	I	Y	S	K	R	T	Y	--	L	Q	K	V	D	G	L	T	O	F	K	D	V	N	F	C	Y	P	T	R	E	V	K	V	L	K	G	V	N	K	V	E	P	G	Q	T	I			
Cg 4059700	:	GOASS	F	A	P	A	A	K	A	K	S	A	A	H	I	I	M	I	K	A	F	D	T	V	S	I	D	I	Y	S	K	R	T	Y	--	L	Q	K	V	D	G	L	T	O	F	K	D	V	N	F	C	Y	P	T	R	E	V	K	V	L	K	G	V	N	K	V	E	P	G	Q	T	I			
			*	1220	*	1240	*	1260	*	1280																																																																	
MgMdr2	:	ALVGT	S	G	C	K	S	T	V	A	L	I	E	R	F	Y	D	E	A	C	S	V	L	L	D	K	Y	N	V	K	D	L	N	V	F	L	R	S	Q	T	G	I	V	S	Q	E	P	I	L	F	D	C	S	I	R	D	N	I	A	Y	G	D	N	S	R	T	P	S	M	D	E	I			
Cg_gi 4059	:	ALVGS	S	G	C	K	S	T	V	A	L	I	E	R	F	Y	D	E	A	C	S	V	L	L	D	K	Y	N	V	K	D	L	N	V	F	L	R	S	Q	T	G	I	V	S	Q	E	P	I	L	F	D	C	S	I	R	D	N	I	A	Y	G	D	N	S	R	E	V	P	M	A	E	I			
hABCb1/MDR	:	ALVGS	S	G	C	K	S	T	V	A	L	I	E	R	F	Y	D	E	A	C	S	V	L	L	D	K	Y	N	V	K	D	L	N	V	F	L	R	S	Q	T	G	I	V	S	Q	E	P	I	L	F	D	C	S	I	A	E	N	I	A	Y	G	D	N	S	R	V	S	Q	E	I					
hABCb4/MDR	:	ALVGS	S	G	C	K	S	T	V	A	L	I	E	R	F	Y	D	E	A	C	S	V	L	L	D	K	Y	N	V	K	D	L	N	V	F	L	R	S	Q	T	G	I	V	S	Q	E	P	I	L	F	D	C	S	I	A	E	N	I	A	Y	G	D	N	S	R	V	S	Q	E	I					
Ca_AET3445	:	ALVGT	S	G	C	K	S	T	V	A	L	I	E	R	F	Y	D	E	A	C	S	V	L	L	D	K	Y	N	V	K	D	L	N	V	F	L	R	S	Q	T	G	I	V	S	Q	E	P	I	L	F	D	C	S	I	A	E	N	I	A	Y	G	D	N	S	R	E	V	P	M	A	E	I			
MgMdr1	:	ALVGS	S	G	C	K	S	T	V	A	L	I	E	R	F	Y	D	E	A	C	S	V	L	L	D	K	Y	N	V	K	D	L	N	V	F	L	R	S	Q	T	G	I	V	S	Q	E	P	I	L	F	N	C	S	I	S	D	N	I	A	Y	G	L	E	E	T	A	G	M	D	D	V	I			
McABS83556	:	ALVGS	S	G	C	K	S	T	V	A	L	I	E	R	F	Y	D	E	A	C	S	V	L	L	D	K	Y	N	V	K	D	L	N	V	F	L	R	S	Q	T	G	I	V	S	Q	E	P	I	L	F	N	C	S	I	R	D	N	I	A	Y	G	L	E	E	T	A	G	M	D	D	V	I			
Cg 4059700	:	ALVGS	S	G	C	K	S	T	V	A	L	I	E	R	F	Y	D	E	A	C	S	V	L	L	D	K	Y	N	V	K	D	L	N	V	F	L	R	S	Q	T	G	I	V	S	Q	E	P	I	L	F	D	C	S	I	R	D	N	I	A	Y	G	L	E	E	T	A	G	M	D	D	V	I			
			*	1300	*	1320	*	1340	*	1360																																																																	
MgMdr2	:	KAARN	A	N	I	H	E	F	T	S	L	P	D	G	Y	D	T	N	V	G	K	G	T	Q	L	S	G	G	Q	Q	R	V	A	I	A	R	A	L	L	R	N	P	R	I	L	L	L	D	E	A	T	S	A	L	D	T	E	S	E	K	I	V	Q	E	A	L	D	K	A	R	E	G	R	T	
Cg_gi 4059	:	EAARK	A	N	I	H	E	F	T	S	L	P	N	G	Y	D	T	L	C	G	D	K	G	T	Q	L	S	G	G	Q	Q	R	V	A	I	A	R	A	L	L	R	N	P	K	I	L	L	L	D	E	A	T	S	A	L	D	T	E	S	E	K	I	V	Q	E	A	L	D	K	A	R	E	G	R	T
hABCb1/MDR	:	RAAKE	A	N	I	H	E	F	T	S	L	P	N	K	Y	S	T	K	V	G	D	K	G	T	Q	L	S	G	G	Q	Q	R	I	A	I	A	R	A	L	L	R	N	P	P	I	L	L	L	D	E	A	T	S	A	L	D	T	E	S	E	K	I	V	Q	E	A	L	D	K	A	R	E	G	R	T
hABCb4/MDR	:	SAAKA	A	N	I	H	E	F	T	S	L	P	H	K	Y	E	T	R	V	G	D	K	G	T	Q	L	S	G	G	Q	Q	R	I	A	I	A	R	A	L	L	R	N	P	P	I	L	L	L	D	E	A	T	S	A	L	D	T	E	S	E	K	I	V	Q	E	A	L	D	K	A	R	E	G	R	T
Ca_AET3445	:	SAARN	A	N	I	H	E	F	T	S	L	P	H	Y	E	T	N	V	G	E	K	G	T	Q	L	S	G	G	Q	Q	R	I	A	I	A	R	A	L	L	R	N	P	Q	V	L	L	L	D	E	A	T	S	A	L	D	T	E	S	E	K	I	V	Q	E	A	L	D	K	A	R	E	G	R	T	
MgMdr1	:	AAARD	A	N	I	H	E	F	T	S	L	P	M	G	Y	D	T	N	V	G	E	K	G	T	Q	L	S	G	G	Q	Q	R	V	A	I	A	R	A	L	L	R	N	P	K	I	L	L	L	D	E	A	T	S	A	L	D	T	E	S	E	K	I	V	Q	E	A	L	D	K	A	R	E	G	R	T
McABS83556	:																																																																										

8. Anexo

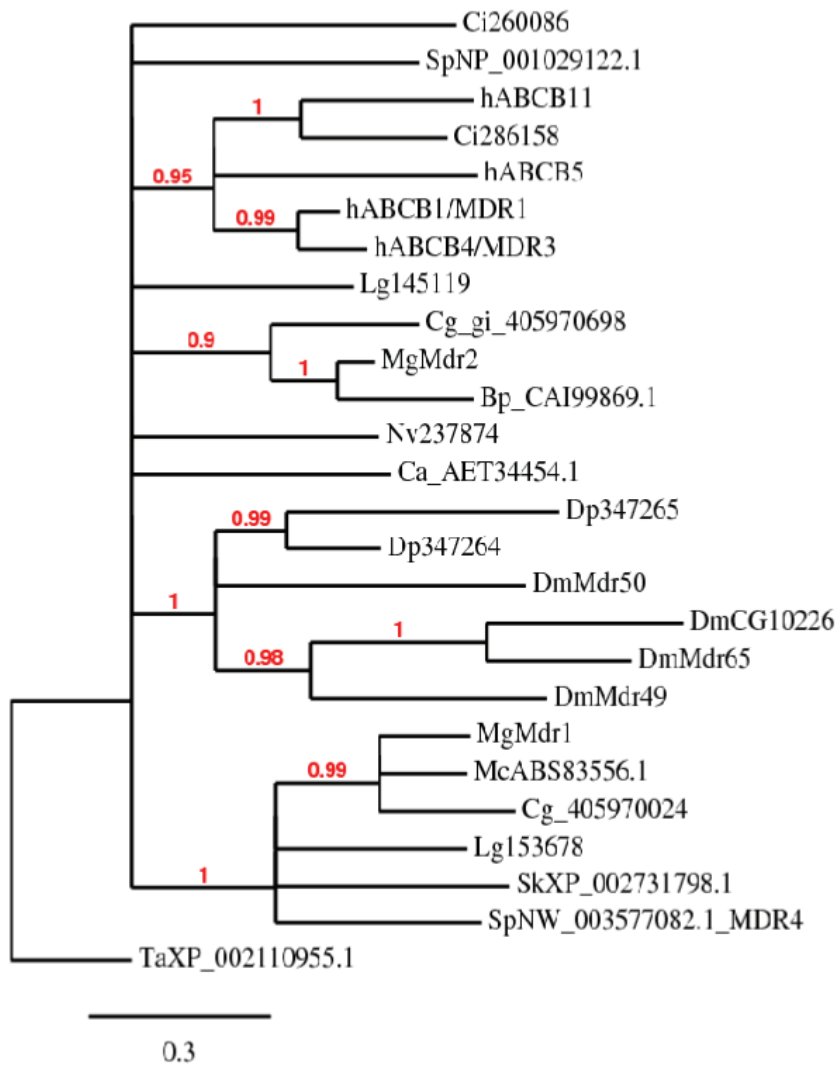
```

                *      1620      *      1640
MgMdr2      : ----- : -
Cg_gi|4059  : VDDPKFCRVDAGGAEDLEFGKCMQRVGVVIAGSNMKIGQFQNFV : 1581
hABCb1/MDR  : ----- : -
hABCb4/MDR  : ----- : -
Ca_AET3445  : ----- : -
MgMdr1      : ----- : -
McABS83556  : ----- : -
Cg|4059700  : ----- : -
```



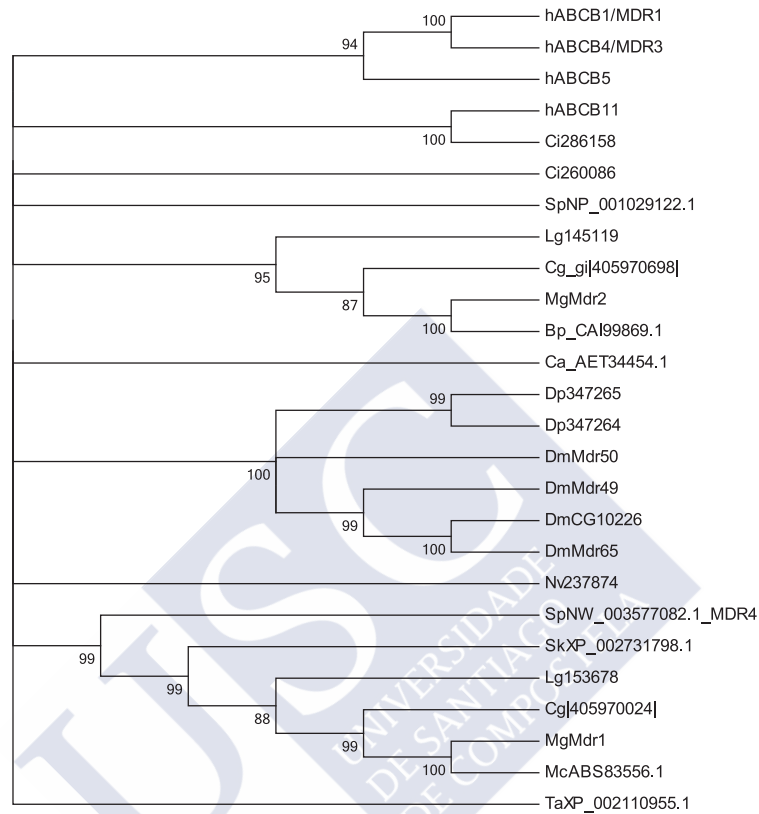
8.3. Árboles filogenéticos

Árboles filogenéticos creados con el servicio en línea www.phylogeny.fr y el programa informático MEGA5. Mg: *M. galloprovincialis*, H: *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, Mc: *M. californianus*, Bp: *Brachidontes pharaonis*, Ca: *Crassostrea ariakensis*, Cg: *C. gigas*, Dp: *Daphnia pulex*, Ci: *Ciona intestinalis*, Lg: *Lottia gigantea*, Sp: *Strongylocentrotus purpuratus*, Sk: *Saccoglossus kowalevskii*, Nv: *Nematostella vectensis*. Se usa una secuencia ABCB de *Trichoplax adherens* (Ta) para enraizar el árbol.



Análisis evolutivo realizado con Phylogeny, alineamiento con muscle, *curation* con g-blocks (selección estricta- 604 aa:35% de las 1715 posiciones originales), análisis Approximate Likelihood-Ratio Test (aLRT): SH-like, filogenia con PhyML y diseño del árbol filogenético con TreeDyn. Ramas colapsadas al 85%.

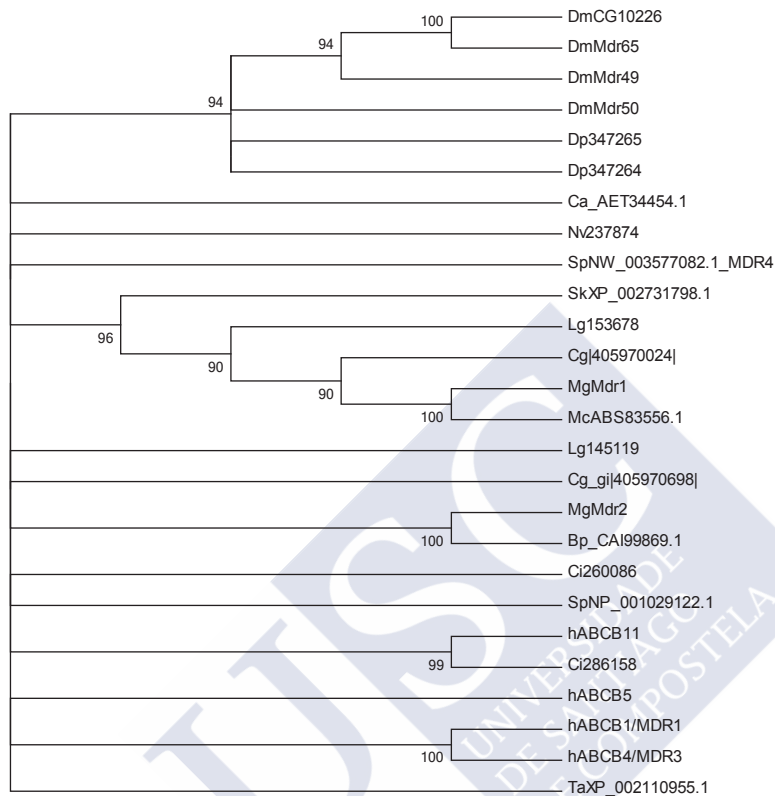
8. Anexo



La historia evolutiva se infiere utilizando el método de **Neighbor-Joining**. Árbol consenso inferido a partir de 2000 repeticiones, las ramas correspondientes a las particiones que representan el colapso con valores menores al 85%. Las distancias evolutivas se calculan utilizando el método matriz, Jones-Taylor-Thornton (JTT), que se basa en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. La tasa de variación entre los sitios fue modelada con una distribución gamma (parámetro de forma = 8). El análisis incluyó 26 secuencias de aminoácidos.

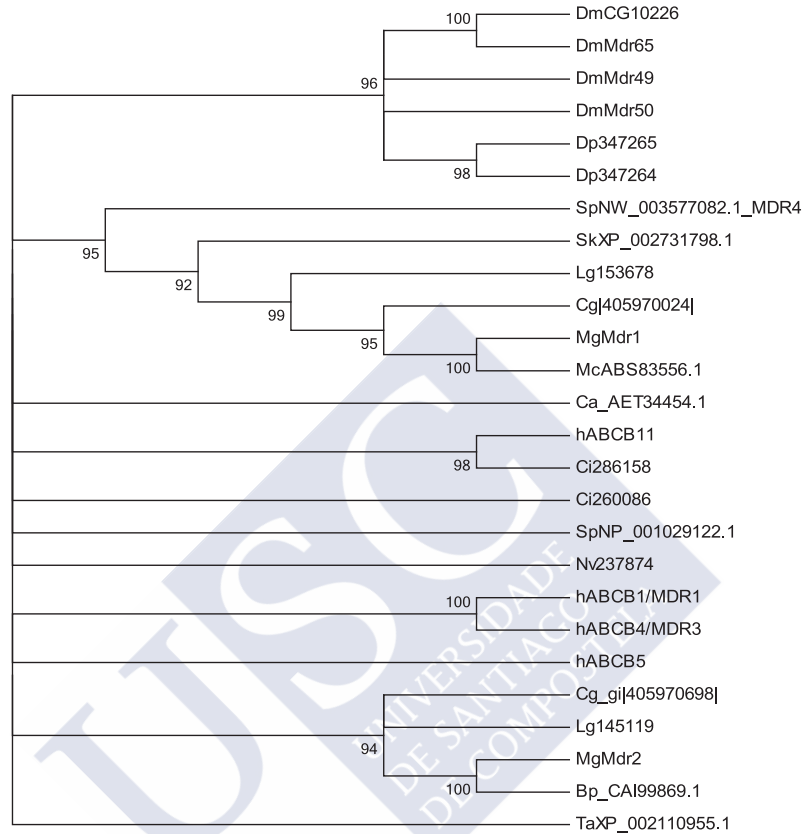
8. Anexo

8.3. Árboles filogenéticos (cont.)



La historia evolutiva se infiere utilizando el método de máxima parsimonia. Árbol consenso inferido a partir de 2000 repeticiones. Las ramas correspondientes a las particiones que representan el colapso, con valores menores al 85%. El árbol de MP se obtuvo utilizando el algoritmo Close-Neighbor-Interchange, con un nivel de búsqueda 1, en la que los árboles iniciales se obtuvieron con la adición aleatoria de secuencias (10 réplicas). El análisis incluyó 26 secuencias de aminoácidos.

8. Anexo

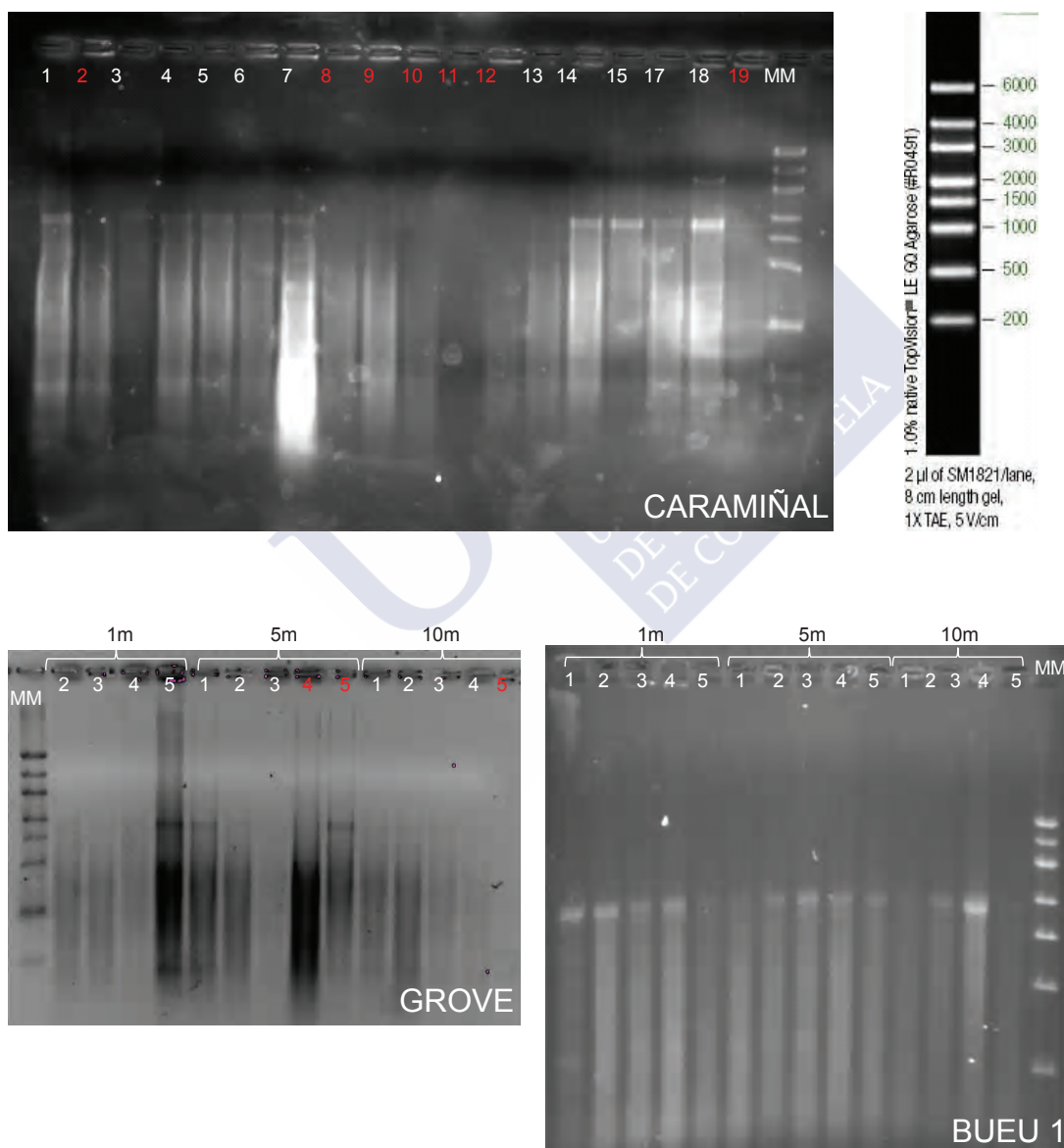


La historia evolutiva se infiere utilizando el método UPGMA. El árbol de consenso inferido a partir de 2000 repeticiones se usa para representar la historia evolutiva de los taxones analizados. Las ramas correspondientes a las particiones que representan el colapso, con valores menores al 85%. Las distancias evolutivas se calculan utilizando el método matriz Jones-Taylor-Thornton (JTT), que se basa en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. La tasa de variación entre los sitios fue modelada con una distribución gamma (parámetro de forma = 8). El análisis incluyó 26 secuencias de aminoácidos.

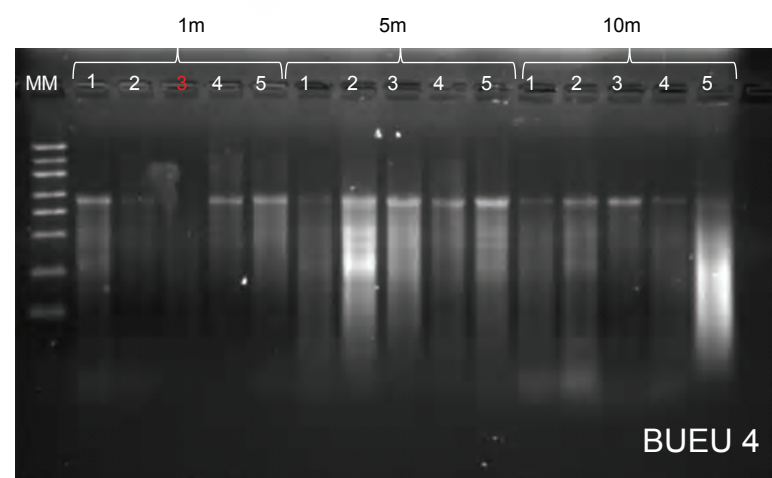
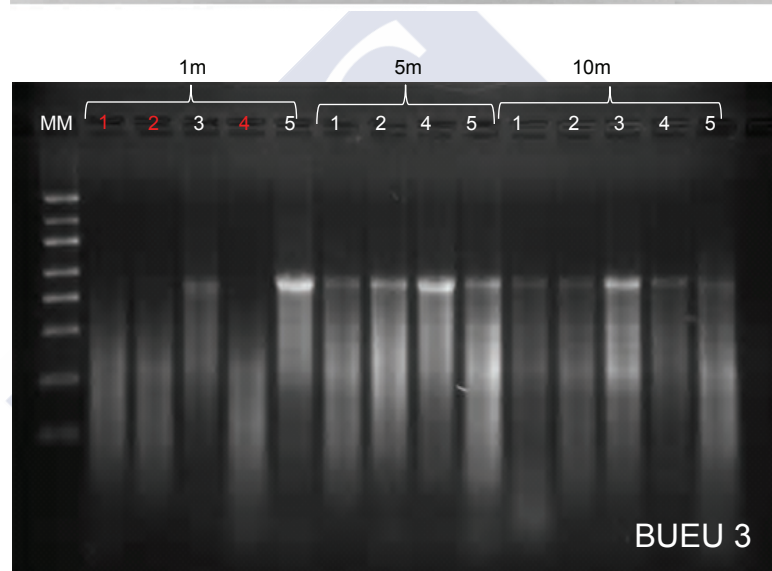
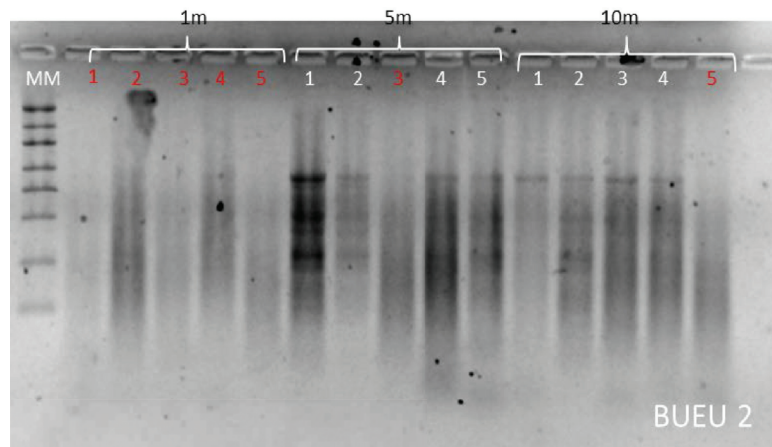
8. Anexo

8.4. Medidas, geles y gráficas de la RT-QPCR

Geles desnaturalizantes para comprobar el estado de los RNA totales, tras la extracción, en muestras de glándula digestiva, de *M. galloprovincialis*. M: marcador de RNA *RiboRuler™ High Range RNA Ladder* (Fermentas). En rojo, muestras que presentan un RNA degradado o con baja concentración, en las que fue preciso repetir su extracción.



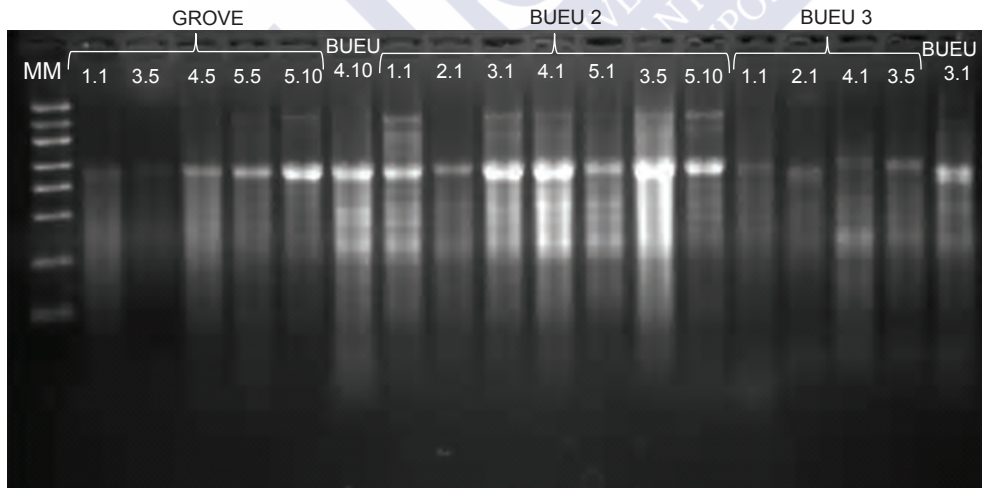
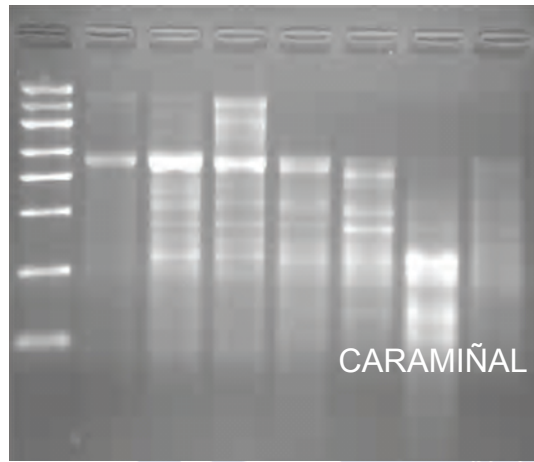
8. *Anexo*



8. Anexo

8.4. Medidas, geles y gráficas de la RT-QPCR (cont.)

Geles desnaturalizantes de las muestras degradadas o con baja concentración.



8. Anexo

Concentración de RNA (ng/μL) medida con el NanoDrop, de las muestras de glándula digestiva de mejillón (*M. galloprovincialis*). C: Muestras control procedentes de A Pobra do Caramiñal (Ría de Arousa). G: Muestras recogidas en O Grove (Ría de Arousa). BU: Muestras recogidas en Bueu (Ría de Pontevedra), a los dos (1-BU), diez (2-BU), dieciséis (3- BU) y setenta y dos días (4- BU) del inicio del episodio tóxico. Muestras según la profundidad: 1m, 5m y 10m.

GLÁNDULA DIGESTIVA

MUESTRA	[RNA] ng/μl	A260/280	A260/230	MUESTRA	[RNA] ng/μl	A260/280	A260/230	MUESTRA	[RNA] ng/μl	A260/280	A260/230
C1	792,03	2,03	2,22	1-BU1_1m	661,13	2,04	2,2	3-BU1_1m	496,86	1,99	2,09
C2	874,15	1,94	1,96	1-BU2_1m	1277,68	2,02	2,02	3-BU2_1m	173,12	1,91	1,32
C3	180,67	1,97	1,84	1-BU3_1m	899,56	2,05	2,13	3-BU3_1m	478	1,97	1,81
C4	964,09	1,98	2,13	1-BU4_1m	1001,26	2,05	2,2	3-BU4_1m	1015,73	2,01	2,21
C5	626,51	1,97	1,97	1-BU5_1m	785,33	2,06	2,21	3-BU5_1m	2159,83	2	2,05
C6	293,19	2,03	2,1	1-BU1_5m	930,61	2,07	2,27	3-BU1_5m	1461,01	2,04	2,25
C7	404,45	2	2,04	1-BU2_5m	651,83	2,06	2,2	3-BU2_5m	2077,58	2,02	2,16
C8	1532,54	2,03	2,23	1-BU3_5m	786,52	2,06	2,24	3-BU3_5m	551,27	2,03	2,14
C9	2703,57	1,61	1,8	1-BU4_5m	1053,56	2,04	2,06	3-BU4_5m	2783,76	2	1,93
C10	581,1	1,91	2,15	1-BU5_5m	909,56	2,06	2,14	3-BU5_5m	2201,45	1,99	2,03
C11	319,84	2,04	2,11	1-BU1_10m	834,38	2,01	2,29	3-BU1_10m	1809,67	1,99	2,13
C13	307	2,03	2,15	1-BU2_10m	610,29	2	1,95	3-BU2_10m	1229,77	2,1	2,28
C14	878	2,01	2,11	1-BU3_10m	1325,55	2,01	2,08	3-BU3_10m	1970,41	1,97	2,05
C15	450,88	1,9	1,53	1-BU4_10m	1860,14	1,99	2,25	3-BU4_10m	1008,22	2,02	2,02
C16	444,63	2,02	2,02	1-BU5_10m	653,84	2,03	2,2	3-BU5_10m	2533,66	1,97	2,19
C17	413,52	2,02	2,23	2-BU1_1m	1562,6	2	2,25	4-BU1_1m	783,63	1,92	2,07
C18	428,54	1,97	2,12	2-BU2_1m	1000,44	2	2,17	4-BU2_1m	394,24	1,85	1,2
C19	81,44	1,9	1,8	2-BU3_1m	2147,56	2,02	2,23	4-BU3_1m	368,2	1,94	2,07
G1_1m	419,84	2,01	2,19	2-BU4_1m	3155,13	1,64	1,76	4-BU4_1m	347,77	1,98	1,51
G2_1m	258,27	2,02	2,14	2-BU5_1m	1524,37	2,04	2,21	4-BU5_1m	994,67	1,95	2,03
G3_1m	104	2,07	2,05	2-BU1_5m	2015,91	2,06	2,25	4-BU1_5m	910,29	1,91	1,97
G4_1m	212,59	1,95	1,98	2-BU2_5m	912,86	2,05	2,28	4-BU2_5m	2279,42	1,61	1,73
G5_1m	315	2,01	2,06	2-BU3_5m	4169,71	1,11	1,24	4-BU3_5m	1999,82	1,53	1,67
G1_5m	515,17	2,03	2,16	2-BU4_5m	2781,93	2	2,17	4-BU4_5m	305,09	1,76	1,21
G2_5m	346,55	2,04	2,1	2-BU5_5m	2076	1,97	1,94	4-BU5_5m	1270,59	1,67	1,82
G3_5m	62,26	1,93	1,51	2-BU1_10m	4241,9	1,08	1,16	4-BU1_10m	1056,99	1,71	2,01
G4_5m	1184,19	1,97	2,27	2-BU2_10m	1469,58	2,06	2,31	4-BU2_10m	1797,13	1,87	1,91
G5_5m	976,78	1,92	2,19	2-BU3_10m	1707	2,03	2,28	4-BU3_10m	613,54	1,76	1,7
G1_10m	408,75	2,09	2,03	2-BU4_10m	1948,62	2,02	2,2	4-BU4_10m	555,26	1,82	2,13
G2_10m	239,19	2,05	2,11	2-BU5_10m	1178,36	2	2,23	4-BU5_10m	294,12	2,02	2,12
G3_10m	362,86	2	2								
G4_10m	152	1,88	1,98								
G5_10m	989,87	1,97	2,21								

8. Anexo

8.4. Medidas, geles y gráficas de la RT-QPCR (cont.)

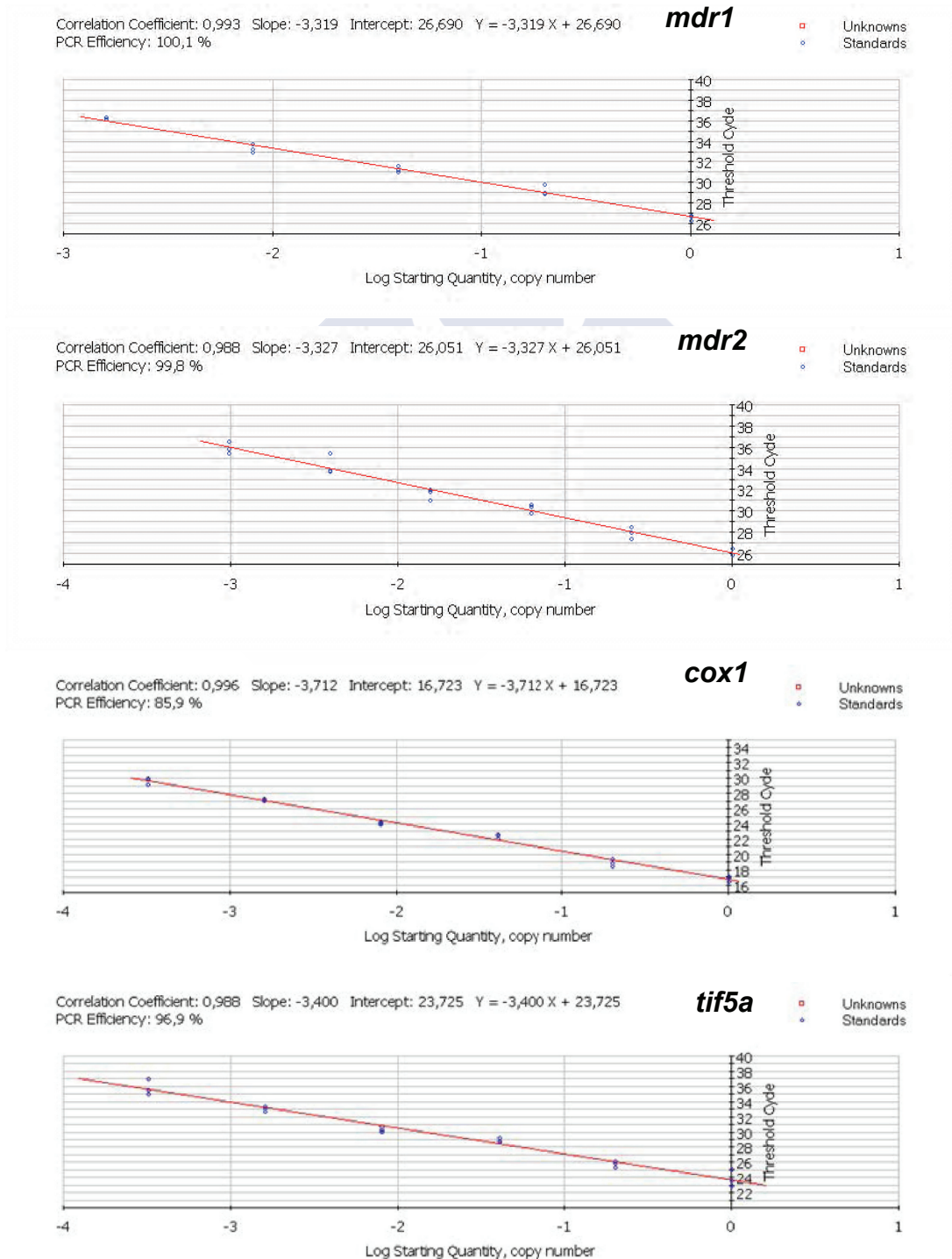
Medidas de Cq y eficiencia, obtenidas con el iCycler en glándula digestiva de mejillón (*M. galloprovincialis*). C: Muestras control procedentes de A Pobra do Caramiñal (Ría de Arousa). G: Muestras recogidas en O Grove (Ría de Arousa). B: Muestras recogidas en Bueu (Ría de Pontevedra), a los dos (B.1), diez (B.2), dieciséis (B.3) y setenta y dos días (B.4) del inicio del episodio tóxico. Muestras según la profundidad: 1m, 5m y 10m.

Glándula digestiva

MUESTRA	nd4	gapdh	cox1	rps27	tif5a	rps4	act	18S		nd4	gapdh	cox1	rps27	tif5a	rps4	act	18S	
CONTROL - SIN TOXINA. (CARAMIÑAL)	C 1	20.5	22	17.1	20.5	22.4	19.7	24.8	18.5	B 2.1.1	18.4	21.7	15.4	20.6	22.2	20.1	26.2	19.6
	C 2	20.3	22	18.5	18.7	22.9	19.9	24.3	18.3	B 2.2.1	19.8	23.3	16.5	19.7	24.6	21	26.3	19.3
	C 3	25.7	22.7	17.8	21.8	22.7	21	26.3	19.5	B 2.3.1	19.7	21.6	16.2	22.9	22.7	20	25.8	19.7
	C 4	24.4	23.9	18.5	21.7	23.5	21.8	28.2	22.7	B 2.4.1	19.7	22.3	17.8	23.8	23.3	20.9	27.1	19.8
	C 5	26.9	22.1	18	21.3	23.5	20.1	25	18.6	B 2.5.1	21.3	22.3	15.9	24.1	23.3	20.8	26.2	20.5
	C 6	24.9	21.1	17.8	21.8	21.9	19.8	24.9	21.7	B 2.1.5	25.3	22.7	15.6	20.5	23.2	20.7	26.8	18.4
	C 7	21.2	23.1	18.2	21.1	24.1	21.9	26.9	18.2	B 2.2.5	19.7	22.9	17.1	23	23.7	21.7	26.9	20.7
	C 8	24.2	21.6	17.2	19.9	22.4	20.3	25.5	19.4	B 2.3.5	20.1	22.7	17.4	20.9	24.5	21.2	27.1	21
	C 9	24.5	23.5	18.2	20.7	24.9	21.2	25	19.9	B 2.4.5	24.9	22.9	18.1	23.3	24.6	21.1	27.8	18.6
	C 10	25.3	23	16.2	21.7	25.2	22.1	26.7	19.8	B 2.5.5	27.1	24.1	20.9	23.4	25.4	23.1	28.8	18.8
	C 11	25.7	25.2	16.3	24	26.4	24.1	27.1	21.7	B 2.1.10	22.6	23.1	18.8	20.4	24.2	21.5	26	19.6
	C 13	20.6	24.4	17.9	25.6	26.6	23.5	26.5	18.4	B 2.2.10	23.9	22.9	17	22	24	21.8	26.7	19.9
	C 14	23.7	22.7	16.8	22.1	27.2	20.9	25.3	21.7	B 2.3.10	25.3	23.1	17.9	21.2	23.9	21.1	26.8	20
	C 15	25.9	21.3	17.2	23.2	23.1	20.2	24.8	18.3	B 2.4.10	22.2	23.1	19	21.7	26.2	21.3	28.2	19.9
	C 16	20.3	23	18.1	24.1	25.1	22.8	25.3	18.4	B 2.5.10	25	22.1	15.5	21.3	24.6	19.1	25.7	18.4
	C 17	24.9	20.8	16.6	21.9	22.2	20.1	25.5	18.4	B 3.1.1	20.2	21.4	16.9	19.2	22.8	19.9	25	18.5
	C 18	18.1	21	15.2	21	21.3	19.3	25.1	18	B 3.2.1	19.4	24.8	17.1	21	26	22.2	25.8	19.5
	C 19	26.8	24.9	18.9	25.3	27.8	24.6	28.6	19	B 3.3.1	21.5	22.7	18	22.7	23.2	21.6	25.9	18.1
	O GROVE (0 DÍAS)	G 1.1	26.1	22	16.8	21.9	23.9	20.6	25.6	18.3	B 3.4.1	20.3	23.3	15.3	20.9	25.1	23.3	28.6
G 2.1		26.6	23.6	17.9	21.9	25.7	21.9	26.5	19.3	B 3.5.1	23.9	21.9	16.9	21.3	22.5	19.5	25.8	18
G 3.1		25.3	23.7	18.6	20.4	27	22.5	26.6	19	B 3.1.5	24.6	23.8	17.6	23.8	24.5	23.1	30.1	19.2
G 4.1		27	23.3	18.5	20.4	25.8	21.6	25.8	19.9	B 3.2.5	24.6	22.1	17.6	22.4	24.2	20.7	25.9	18.3
G 5.1		24.3	21.7	18.3	21.7	23.2	19.3	25.3	20.1	B 3.3.5	18.5	22.3	16.2	21.7	23.2	21.9	25.9	18.8
G 1.5		25.7	21.9	18.2	23	23.6	21.2	26.9	23.8	B 3.4.5	19.7	22	16.5	21.2	22.9	20.2	25	19.1
G 2.5		24.3	23.9	17.7	20.9	26	22.7	27.3	20	B 3.5.5	22.8	22.2	16.7	22.3	25	21.8	24.9	19.1
G 3.5		22.1	24	19.7	22.8	25.2	22.6	25.2	19.5	B 3.1.10	24.6	23.7	18.6	22.1	24.3	22.2	28	19.7
G 4.5		25.2	21.3	16.4	20	22.6	19.9	24.9	18.8	B 3.2.10	19.5	23.1	17.1	21.6	24.7	21.4	28.9	19.2
G 5.5		20	21.2	16	19	23.7	19.7	24.9	19.3	B 3.3.10	20	21.8	16.9	22.8	23.6	20.7	26	19.6
G 1.10		24.3	23	16.4	23.8	24.4	22	26.6	18.9	B 3.4.10	22.3	22.4	18.2	22.7	24.4	21.2	25.3	21.9
G 2.10		24.2	23.1	17.7	22	23.9	21.4	27.9	18.9	B 3.5.10	37.2	37.6	34.5	N/A	N/A	N/A	N/A	33.5
G 3.10		25.1	24.6	18.5	23.5	28.7	22.4	31.2	19.5	B 4.1.1	23.9	22.3	16.7	23.1	28.5	20.9	25.4	19.1
G 4.10		25.5	22.4	16.9	22.4	24.5	21.2	28.5	20.2	B 4.2.1	24.5	22.7	19.2	21.7	22.9	21.1	25.9	17.9
G 5.10	21.6	21.7	16.2	19.7	23.6	20.9	24.9	22.5	B 4.3.1	24	23.7	17.7	21.6	25	22.4	26.8	19	
BUEU 1. (2 DÍAS)	B 1.1.1	23.9	22.6	16.2	20.2	26.4	20.4	27.6	18.4	B 4.4.1	24.3	22.7	17.6	22	23.4	20.8	24.4	19.6
	B 1.2.1	24.4	23.4	18.9	20.9	23.8	21.4	26	18.9	B 4.5.1	23.7	20.5	16.5	19.3	22.8	20	24	18.7
	B 1.3.1	20.8	22.7	16.6	21.8	23.8	22	26.4	26.8	B 4.1.5	20.2	23	16.8	20.9	23.1	21.7	26	17.9
	B 1.4.1	23.6	21.9	16.9	22.7	23.2	20.4	25.3	18	B 4.2.5	24.9	23.6	17.3	23.8	25	22.9	27.6	19
	B 1.5.1	20.6	22.6	18.1	19.6	24.8	21.1	28.3	23.7	B 4.3.5	20.4	23.4	17.5	21.3	23.4	21.3	25	19
	B 1.1.5	24.9	22.9	17.7	20	23.4	22	28.2	22.9	B 4.4.5	18.7	21.7	17.6	20.3	23.6	20	24.5	17.4
	B 1.2.5	20.2	22.7	16.6	22.4	25.9	21.8	28.9	20.4	B 4.5.5	19.9	22.6	16.8	21.6	23.5	22	24.8	18
	B 1.3.5	24	23.2	15.8	22.7	24.9	21	29.5	23.1	B 4.1.10	21.7	23	18.2	21.3	24.5	21	26.8	19.1
	B 1.4.5	27.7	22.2	17.1	24.4	24.4	20.9	26.9	19.2	B 4.2.10	23.4	23.1	17.7	23.1	23.8	21.9	25.9	18.9
	B 1.5.5	25.1	23.8	19.5	21.4	23.9	22.4	27.3	19.7	B 4.3.10	22.3	20.6	16.9	20	22	18.8	24.4	17.9
	B 1.1.10	19.8	22.3	17.2	21.8	22.5	20.1	28	18.7	B 4.4.10	23.8	23.4	17.6	20.8	25.3	20.9	26.7	19.7
	B 1.2.10	24.9	23.9	17.9	21.1	26.9	21.5	27	18.9	B 4.5.10	23.7	22.4	18	20.7	25.5	20	25.8	19
	B 1.3.10	25.2	21.3	16.7	19.2	21.4	19.7	25	17.2	Eficiencia	1.05	0.993	0.859	0.92	0.97	0.911	0.91	0.992
	B 1.4.10	24	23.1	16.5	22.4	27.1	21.8	26.8	19.6									
	B 1.5.10	24.5	22.2	17.9	20.4	24.1	20.3	27.3	19									

8. Anexo

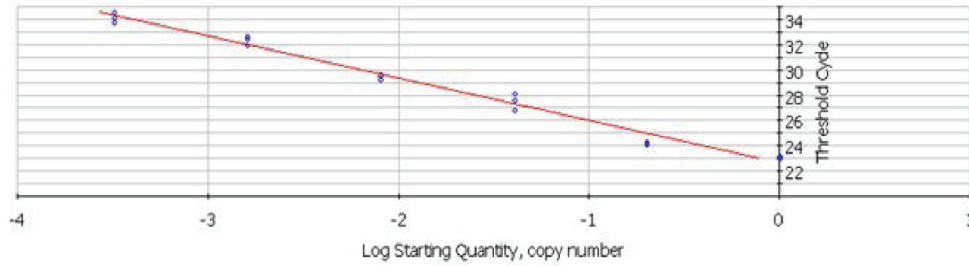
Figura con las curvas estándar de la RT-qPCR de los distintos genes en la glándula digestiva. Las curvas han sido generadas con el Bio-Rad iCycler iQ™ software. Se representan los valores del Cq (ciclo de cuantificación o ciclo umbral; threshold cycle) de cada conjunto de diluciones seriadas frente al logaritmo del factor de dilución del cDNA. La eficiencia de la reacción (E%) viene dada por $[10 (1/-S) - 1] \times 100$, donde S representa la pendiente (slope) de la recta de la regresión lineal.



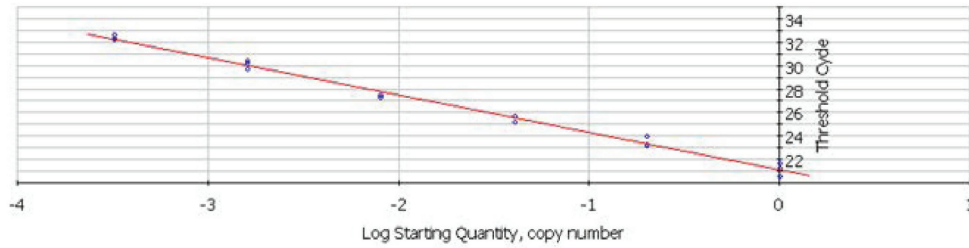
8. Anexo

8.4. Medidas, geles y gráficas de la RT-QPCR (cont.)

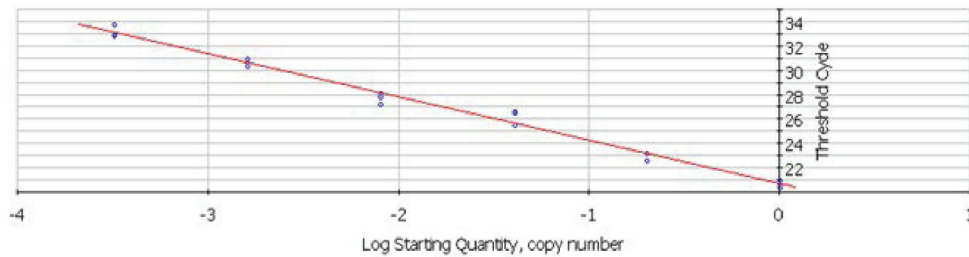
Correlation Coefficient: 0,992 Slope: -3,338 Intercept: 22,669 $Y = -3,338 X + 22,669$ **gapdh** □ Unknowns
PCR Efficiency: 99,3 % ● Standards



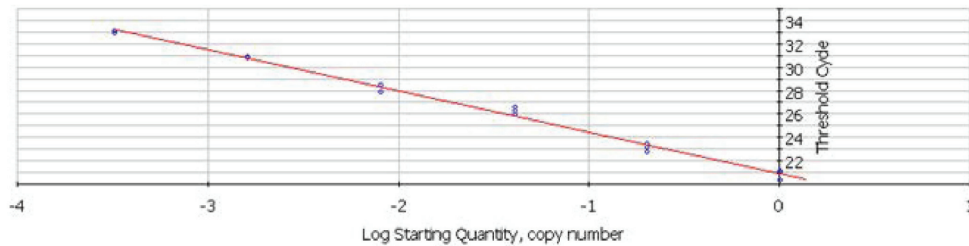
Correlation Coefficient: 0,996 Slope: -3,189 Intercept: 21,156 $Y = -3,189 X + 21,156$ **nd4** □ Unknowns
PCR Efficiency: 105,8 % ● Standards



Correlation Coefficient: 0,994 Slope: -3,554 Intercept: 20,722 $Y = -3,554 X + 20,722$ **rps4** □ Unknowns
PCR Efficiency: 91,1 % ● Standards



Correlation Coefficient: 0,996 Slope: -3,531 Intercept: 20,939 $Y = -3,531 X + 20,939$ **rps27** □ Unknowns
PCR Efficiency: 92,0 % ● Standards



8. Anexo

Correlation Coefficient: 0,993 Slope: -3,557 Intercept: 24,956 $Y = -3,557 X + 24,956$
PCR Efficiency: 91,0 %

act

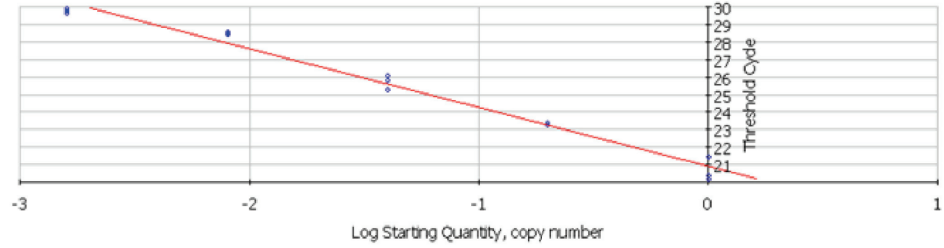
Unknowns
Standards



Correlation Coefficient: 0,990 Slope: -3,342 Intercept: 20,944 $Y = -3,342 X + 20,944$
PCR Efficiency: 99,2 %

18S

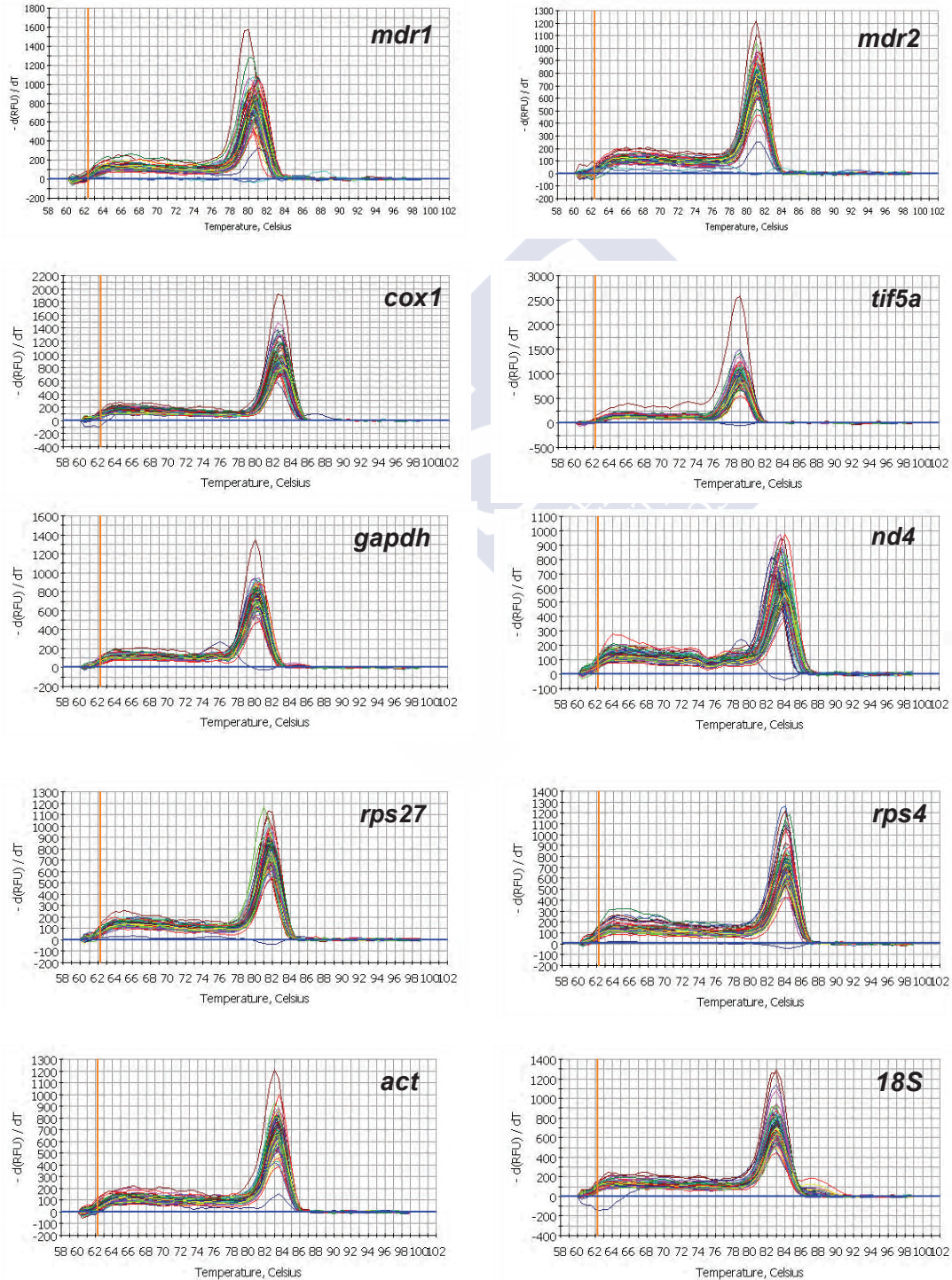
Unknowns
Standards



8. Anexo

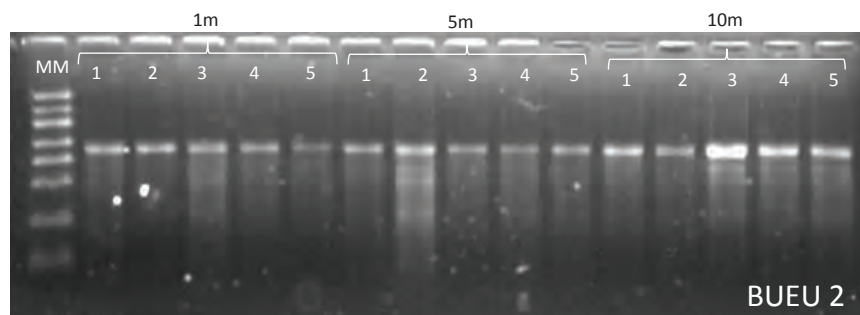
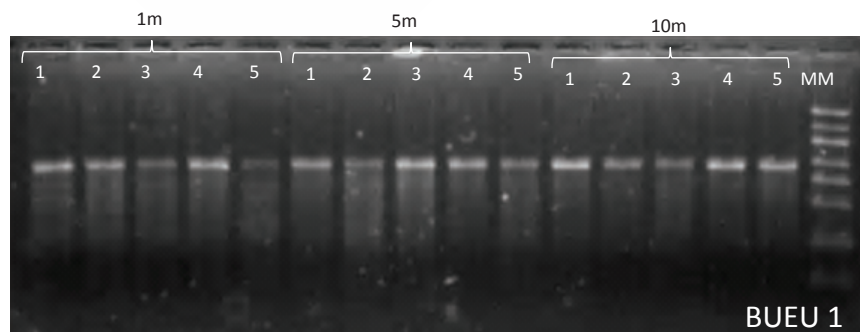
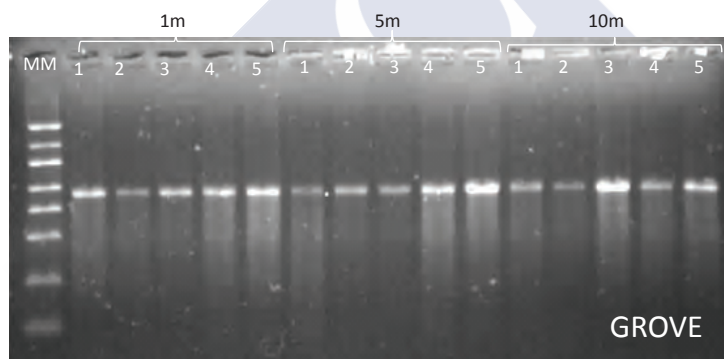
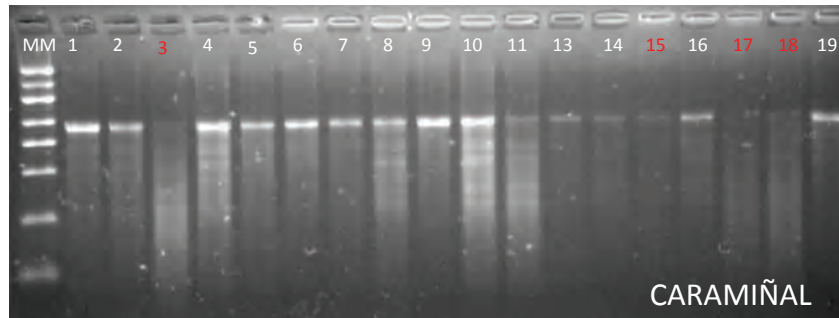
8.4. Medidas, geles y gráficas de la RT-QPCR (cont.)

Figura con el análisis de las curvas de fusión de los distintos genes en la glándula digestiva. Las curvas han sido generadas con el software Bio-Rad iCycler iQ™.



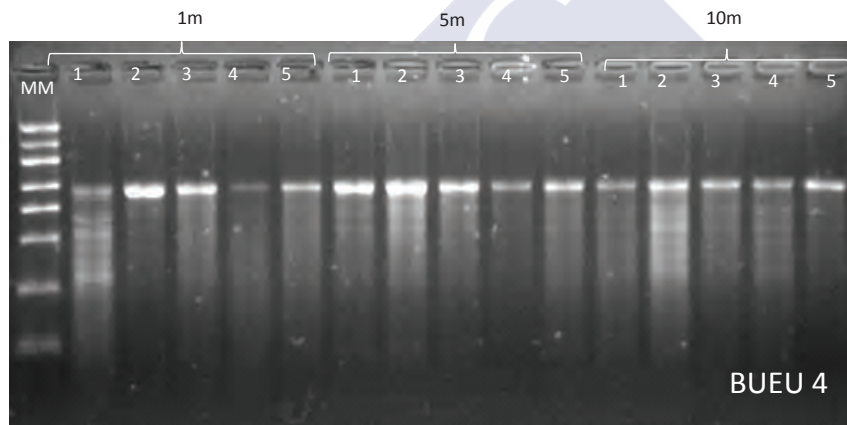
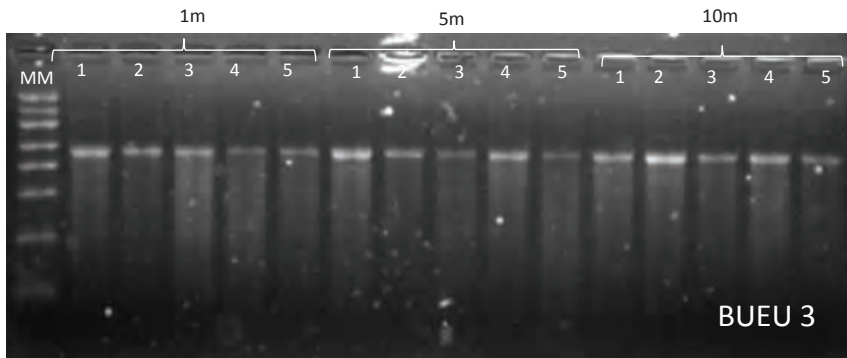
8. Anexo

Geles desnaturalizantes para comprobar el estado de los RNA totales, tras la extracción, en muestras de branquia, de *M. galloprovincialis*. M: marcador de RNA *RiboRuler™ High Range RNA Ladder* (Fermentas). En rojo, muestras que presentan un RNA degradado o con baja concentración, en las que fue preciso repetir su extracción.

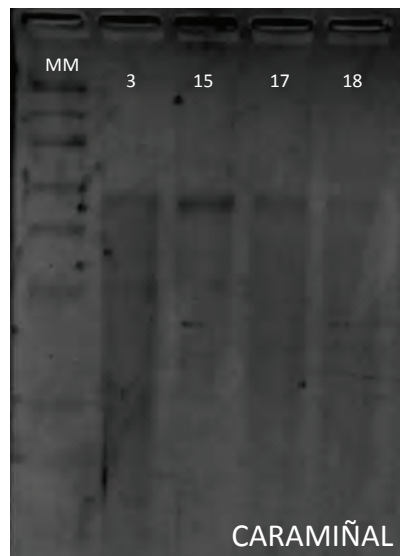


8. Anexo

8.4. Medidas, geles y gráficas de la RT-QPCR (cont.)



Gel desnaturalizante de las muestras degradadas o con baja concentración.



8. Anexo

Concentración de RNA (ng/μL) medida con el NanoDrop, de las muestras de branquia de mejillón (*M. galloprovincialis*). C: Muestras control procedentes de A Pobra do Caramiñal (Ría de Arousa). G: Muestras recogidas en O Grove (Ría de Arousa). BU: Muestras recogidas en Bueu (Ría de Pontevedra), a los dos (1-BU), diez (2-BU), dieciséis (3- BU) y setenta y dos días (4- BU) del inicio del episodio tóxico. Muestras según la profundidad: 1m, 5m y 10m.

BRANQUIA											
MUESTRA	[RNA] ng/μl	A260/280	A260/230	MUESTRA	[RNA] ng/μl	A260/280	A260/230	MUESTRA	[RNA] ng/μl	A260/280	A260/230
C1	384,89	2,03	2,15	1-BU1_1m	577,53	2,04	2,2	3-BU1_1m	514,95	2,07	2,2
C2	249,84	2,04	2,08	1-BU2_1m	609,85	2,03	2,11	3-BU2_1m	308,79	2,04	2,05
C3	204,52	1,97	1,91	1-BU3_1m	355,65	2,03	1,72	3-BU3_1m	582,56	2,05	2,22
C4	682,49	2,05	2,24	1-BU4_1m	462,41	2,03	2,18	3-BU4_1m	383,84	2,04	2,15
C5	359,05	2,03	2,13	1-BU5_1m	324,03	2,03	2,11	3-BU5_1m	319,73	2,05	2,1
C6	279,72	2,04	2,13	1-BU1_5m	457,27	2,02	2,18	3-BU1_5m	399,33	2,04	2,06
C7	221,5	2,04	2,09	1-BU2_5m	454,15	2,03	2,16	3-BU2_5m	265,71	2,06	2,06
C8	455,72	2,01	2,11	1-BU3_5m	524,75	2,05	2,18	3-BU3_5m	307,26	2,03	2,07
C9	255,64	2,05	2,15	1-BU4_5m	575,2	2,07	2,22	3-BU4_5m	348,88	2,04	2,11
C10	708,44	2,07	2,25	1-BU5_5m	338,54	2,05	2,17	3-BU5_5m	380,46	2,03	2,17
C11	419,44	2,03	2,19	1-BU1_10m	378,6	2,04	2,16	3-BU1_10m	344,86	2,04	2
C13	111,69	2,03	1,97	1-BU2_10m	280,07	2,05	2,14	3-BU2_10m	371,95	2,04	2,14
C14	101,83	2,02	1,98	1-BU3_10m	336,64	2,04	2,2	3-BU3_10m	198,39	2,03	2,04
C15	69,84	1,86	1,29	1-BU4_10m	411,17	2,04	2,21	3-BU4_10m	309,22	2,05	1,98
C16	189,42	2,03	2,05	1-BU5_10m	406,04	2,02	2,19	3-BU5_10m	181,33	2,06	1,98
C17	159,96	1,96	1,8	2-BU1_1m	193,72	2,03	2,03	4-BU1_1m	957,53	2,06	2,25
C18	240,21	2	2,01	2-BU2_1m	164,14	2,01	1,93	4-BU2_1m	514,56	2,07	2,19
C19	210,08	2,02	2,01	2-BU3_1m	576,09	2,08	2,28	4-BU3_1m	333,53	2,02	2,14
G1_1m	303,91	2,02	2,1	2-BU4_1m	291,51	2,03	2,12	4-BU4_1m	227,14	2,01	2,11
G2_1m	149,55	1,99	2	2-BU5_1m	248,18	2,02	2,11	4-BU5_1m	273,26	2,03	2,1
G3_1m	172,29	2,03	2,01	2-BU1_5m	277,85	2,04	2,12	4-BU1_5m	367,88	2,03	2,21
G4_1m	330,62	2,03	2,15	2-BU2_5m	737,78	2,06	2,26	4-BU2_5m	604,02	2,02	2,24
G5_1m	418,71	2,03	2,2	2-BU3_5m	311,92	2,04	2,16	4-BU3_5m	362	2,04	2,17
G1_5m	236,75	2,03	2,11	2-BU4_5m	451,13	2,01	2,03	4-BU4_5m	226,95	2	1,95
G2_5m	167,97	2	2,07	2-BU5_5m	430,54	2,02	2,1	4-BU5_5m	371,88	2,03	2,13
G3_5m	231,33	2	2,11	2-BU1_10m	342,3	2,02	2,13	4-BU1_10m	399,45	2,03	2,16
G4_5m	413,54	2,02	2,15	2-BU2_10m	330,55	1,98	2,04	4-BU2_10m	790,45	2,02	2,22
G5_5m	344,18	2,03	2,16	2-BU3_10m	685,2	2,08	2,24	4-BU3_10m	387,26	2,03	2,07
G1_10m	214,93	2,02	2,04	2-BU4_10m	576,47	2,07	2,25	4-BU4_10m	340,29	2,04	2,16
G2_10m	87,32	1,97	1,83	2-BU5_10m	613,44	2,09	2,27	4-BU5_10m	254,37	2,04	2,14
G3_10m	297,81	2,04	2,16								
G4_10m	219	2,02	2,08								
G5_10m	263,94	2,01	2,08								

8. Anexo

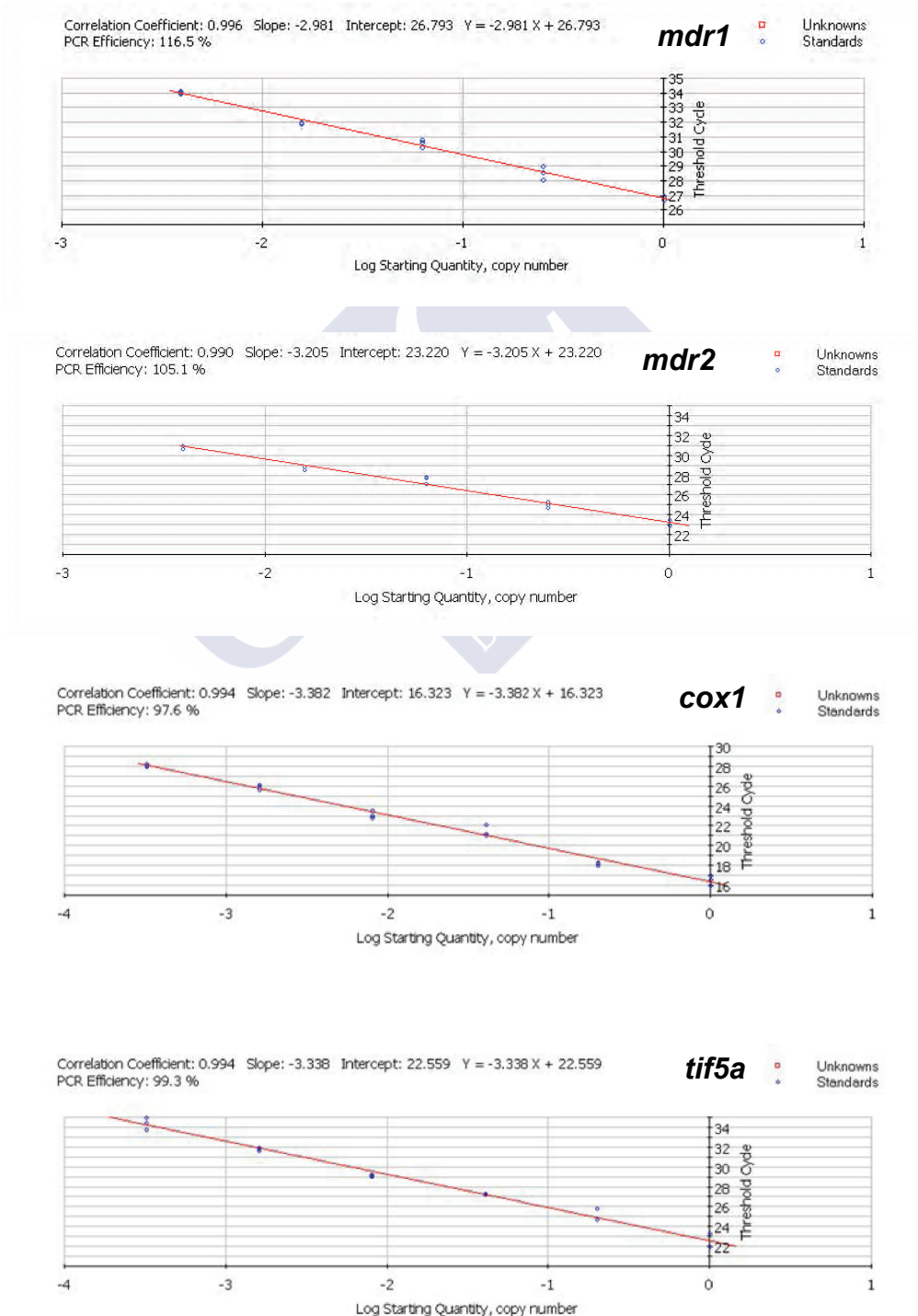
8.4. Medidas, geles y gráficas de la RT-QPCR (cont.)

Medidas de Cq y eficiencia, obtenidas con el iCycler en branquia de mejillón (*M. galloprovincialis*). C: Muestras control procedentes de A Pobra do Caramiñal (Ría de Arousa). G: Muestras recogidas en O Grove (Ría de Arousa). B: Muestras recogidas en Bueu (Ría de Pontevedra), a los dos (B.1), diez (B.2), dieciséis (B.3) y setenta y dos días (B.4) del inicio del episodio tóxico. Muestras según la profundidad: 1m, 5m y 10m.

		Branquia																	
MUESTRA		nd4	gapdh	cox1	rps27	tif5a	rps4	act	18S		nd4	gapdh	cox1	rps27	tif5a	rps4	act	18S	
CONTROL - SIN TOXINA. (CARAMIÑAL)	C 1	20.8	21.5	16.1	20.5	24.4	19.9	23.7	18.1	BUEU 2. (10 DÍAS)	B 2.1.1	19.7	20.2	15.6	19.1	21.4	18.8	24.1	17.9
	C 2	20.3	20.8	16.8	19.5	23	19.5	24	19.3		B 2.2.1	20	21.5	17	19.6	22.9	19.7	24.4	19.6
	C 3	21	22.1	16.7	20.6	22.5	20.5	26.1	19		B 2.3.1	19.6	21	16.2	21.4	22.3	20	24.8	18.9
	C 4	21.3	22.5	16.7	20.2	24.1	20.7	25.5	19.3		B 2.4.1	19.3	20.9	17.1	21.1	24.7	19.7	25.2	19.5
	C 5	21.6	20.9	16.7	20.3	24.4	19.9	25.5	18.8		B 2.5.1	19.4	19.8	16.2	20.1	22.1	19.2	24.3	18.4
	C 6	23.3	20	16.2	20.5	24.1	21.4	24.8	18.6		B 2.1.5	22	19.8	15.8	18.8	21.2	18.9	23.1	18.9
	C 7	20.8	20.7	17.2	19.2	22.4	20	26	19.4		B 2.2.5	19.8	21.6	16.6	21.8	22.9	20.4	26.1	19.1
	C 8	21.5	22.3	16.7	20.6	23.6	20.9	25.7	18.7		B 2.3.5	19.1	20.5	15.8	18.9	23.1	19.3	25.7	19.2
	C 9	22.9	21.3	17.1	19.8	24.5	20.6	24.7	19.6		B 2.4.5	20.4	20.6	16	21.8	22.3	19.4	24.7	20.1
	C 10	21.7	22.4	16.9	20.6	25.6	21	24.7	19.7		B 2.5.5	20.4	21.2	16.5	19.5	23.1	20	25.1	19.8
	C 11	20.1	21.4	15.3	19.8	23.5	20.7	24.5	18.9		B 2.1.10	18	19.8	15	17.9	23	19.4	23.7	21.4
	C 13	19.3	20.1	16.5	20.1	21.8	19.4	23.7	19.2		B 2.2.10	22	19.6	15.9	18.9	21.8	19	26.2	19.1
	C 14	20.8	22	16.1	21.4	27	21.4	26.3	20.8		B 2.3.10	21.8	21	16	20.8	22.3	20	24.1	19.7
	C 15	26.7	26.9	24.2	30.1	30.3	25.3	30.8	20		B 2.4.10	20	20.6	16.1	20.1	27.7	19.3	23.5	18.6
	C 16	19.7	19.6	16.3	20.2	22.8	19.8	23.9	18.7		B 2.5.10	21	21.2	16.1	20.4	23.2	19.8	24.4	18.6
	C 17	21.8	21.3	16.8	21.5	23.8	20.9	26.3	21.2										
	C 18	19.2	22.1	16.1	20.7	23.4	20.7	27	19.7		B 3.1.1	18.9	20.4	15.4	18.3	23.8	19	24	18
	C 19	22	20.3	15.9	20.3	23	19.5	23.8	18.4		B 3.2.1	18.9	21.9	15.9	18.7	24.1	19.4	24.2	18.9
											B 3.3.1	18.7	20.8	15.7	20.5	23.8	20.4	23.8	19.6
O GROVE (0 DÍAS)	G 1.1	23	21.2	16.5	21	24	19.3	26.8	20.7	B 3.4.1	19.8	21.3	15.8	19	22.7	20.1	25	19.3	
	G 2.1	21	20.8	17.1	19.6	22.8	19.2	25.7	20.8	B 3.5.1	21.9	21.1	16.4	21.1	23	20.4	25.8	17.8	
	G 3.1	21.7	20.5	16.8	18.9	23.4	19.3	24.9	19.4	B 3.1.5	21.1	21	16.9	20.8	22.8	19.7	25	20.7	
	G 4.1	20.4	20.5	15.8	19.2	22.1	19.1	23.9	18.3	B 3.2.5	20.9	21	16.4	20.5	23.8	20	24.5	19	
	G 5.1	19.1	20.1	15.2	19.1	21	18.1	23.2	18.3	B 3.3.5	19	23.1	16.5	21.3	24.2	21.3	25.3	19.5	
	G 1.5	21.1	20.8	16.6	20.3	22.6	19.9	24.8	17.9	B 3.4.5	18.7	20.6	15.4	19.8	22.2	19.2	24.1	17.6	
	G 2.5	22.3	19.5	15.1	18.2	22.7	18.5	24.2	18.4	B 3.5.5	20.8	21.5	16.3	20.6	23.9	20.4	23.9	20.7	
	G 3.5	19.6	19.7	15.8	18.7	21.7	18.4	23.9	18	B 3.1.10	22.1	22.1	17.5	20.8	23.3	20.3	25.2	18.8	
	G 4.5	20.6	20.1	15.7	18.6	20.9	18.6	23.6	18.6	B 3.2.10	19	20.8	16.3	19	22.4	18.8	23.3	19.4	
	G 5.5	20.1	20.1	15.5	18.5	22.5	18.3	24	18.3	B 3.3.10	18.9	19.9	16.4	20	23.5	19.3	23.9	20.2	
	G 1.10	20.4	20.2	16.1	20.2	22	18.9	24.2	19	B 3.4.10	20.7	21.9	17.5	20.6	25.9	20.1	27.4	20.5	
	G 2.10	20.5	20.1	16.6	21	24.9	19.2	25.6	20.1	B 3.5.10	23.2	22.1	16.3	20.3	22.4	19.7	23.4	17.5	
	G 3.10	20.6	20	15.6	19.9	21.9	18.9	24.3	18.7	B 4.1.1	21	22.7	16	22.7	28	21.2	27.5	18	
G 4.10	20.9	20.6	16.5	20.1	23.1	19.4	25.4	18.4	B 4.2.1	19.5	19.7	15.4	19.7	21.4	18.7	22	19.7		
G 5.10	19.4	21.4	15.8	19.8	23.1	19.2	24.5	18.6	B 4.3.1	20.7	21.1	16.6	19.8	22.5	20	25.1	21.5		
BUEU 1. (2 DÍAS)	B 1.1.1	21.1	22.6	16.3	20	24.4	20.2	24.8	18.7	B 4.4.1	21.6	22	17.6	19.9	23.9	20	25.8	19.3	
	B 1.2.1	23.6	21.7	16.5	20.9	23.2	19.9	24	17.9	B 4.5.1	20.7	20	15.9	18.9	23.7	20.1	23.8	19.7	
	B 1.3.1	20.9	21.8	16.5	21.7	23.6	20.8	25.5	19.6	B 4.1.5	19.9	20.9	15	19.2	21.9	18.9	23.6	19.3	
	B 1.4.1	20.1	19.5	14.9	19.6	21.4	19	23.3	16.7	B 4.2.5	21.4	21.2	16.2	20.1	22.9	19.8	24.1	20.4	
	B 1.5.1	20.5	22.1	16.5	20.6	23.3	20.9	26.1	17.8	B 4.3.5	20.8	21.2	16.5	19.7	22.5	19.3	22.7	20.5	
	B 1.1.5	20.6	19.8	16.3	19	21.7	19.3	23.3	19	B 4.4.5	20.6	20.2	16.6	19.4	22.9	19.1	24.2	20.3	
	B 1.2.5	19.9	22.9	15.9	21.8	24.1	20.7	24.7	18.5	B 4.5.5	20	20.5	15.9	19	22.8	19.1	24.2	19.1	
	B 1.3.5	20.4	20.9	15.4	21	23	19.5	24.7	18.4	B 4.1.10	20.7	21.1	16.7	20.3	24.5	20	25.1	18.6	
	B 1.4.5	21	20.5	15.9	21.1	23.3	19	23.9	17.3	B 4.2.10	21	22.4	17.1	21.1	23.3	20.7	26.4	18.4	
	B 1.5.5	21.7	21.7	16.9	19.2	23.9	21	25.1	18.8	B 4.3.10	20.2	20.2	15.8	19.4	23.2	19.7	23.9	18	
	B 1.1.10	19	20.7	15.5	20.8	22.3	20.2	24	18.7	B 4.4.10	20.7	21.6	16.1	20.7	24.8	20.4	25.2	20.9	
	B 1.2.10	21.6	22.5	16.6	19.7	27.8	19.4	24.4	18.3	B 4.5.10	20.1	19.5	15.7	18.9	22.7	19	24.1	20.7	
	B 1.3.10	20.3	20.9	15.6	18.8	22	19.9	24.2	17.9	Eficiencia	1.00	1.073	1.976	1.012	0.93	0.935	1.113	0.877	
	B 1.4.10	21.5	20.9	15.9	20.9	26	19.4	24.1	19.7										
	B 1.5.10	20.5	20	15.4	20.2	22.4	19.3	23.3	18.9										

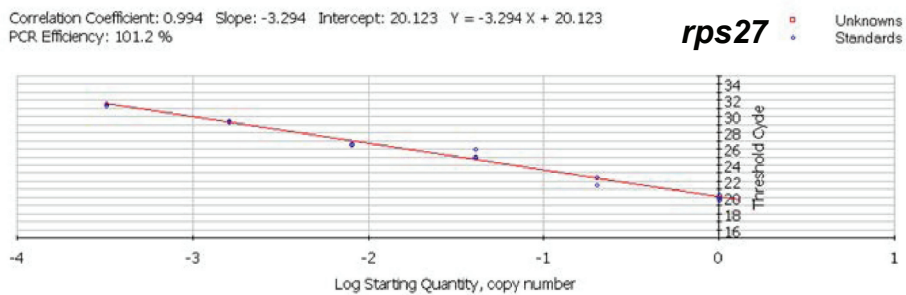
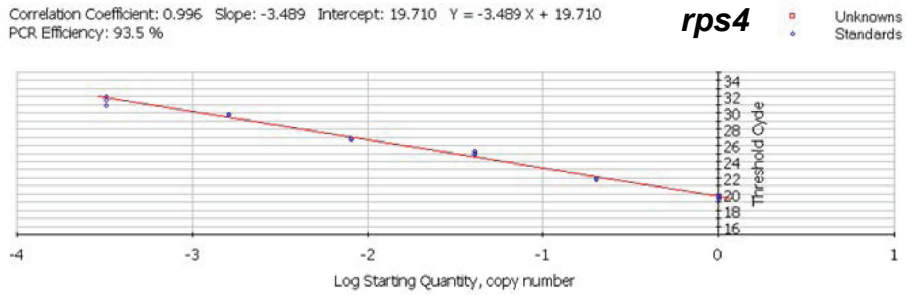
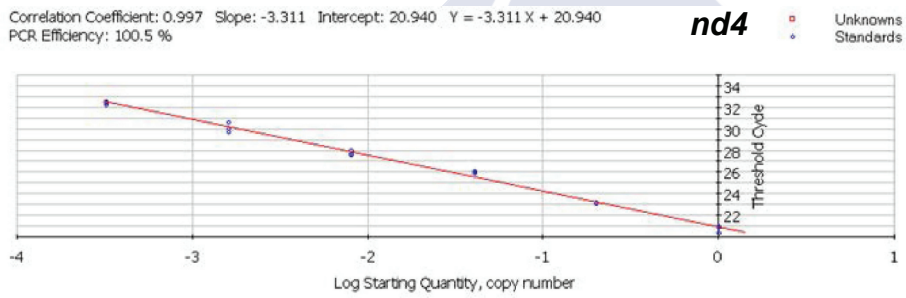
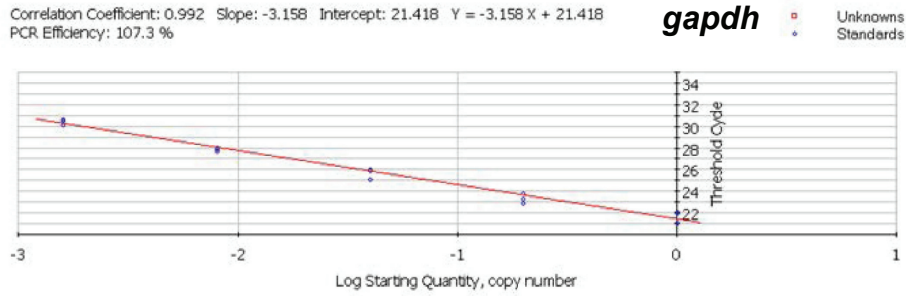
8. Anexo

Figura con las curvas estándar de la RT-qPCR de los distintos genes en la branquia. Las curvas han sido generadas con el Bio-Rad iCycler iQ™ software. Se representan los valores del Cq (ciclo de cuantificación o ciclo umbral; threshold cycle) de cada conjunto de diluciones seriadas frente al logaritmo del factor de dilución del cDNA. La eficiencia de la reacción (E%) viene dada por $[10^{(1/S)} - 1] \times 100$, donde S representa la pendiente (slope) de la recta de la regresión lineal.

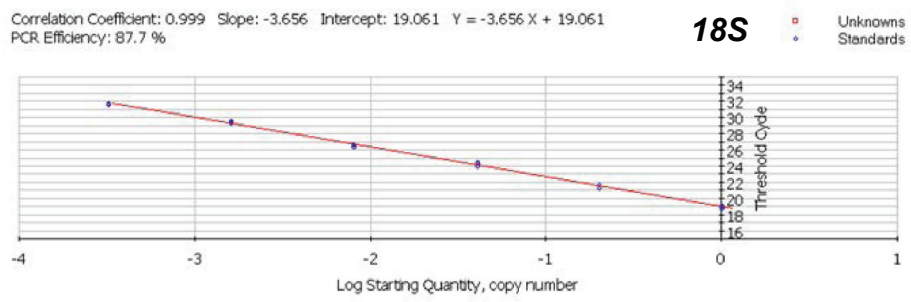
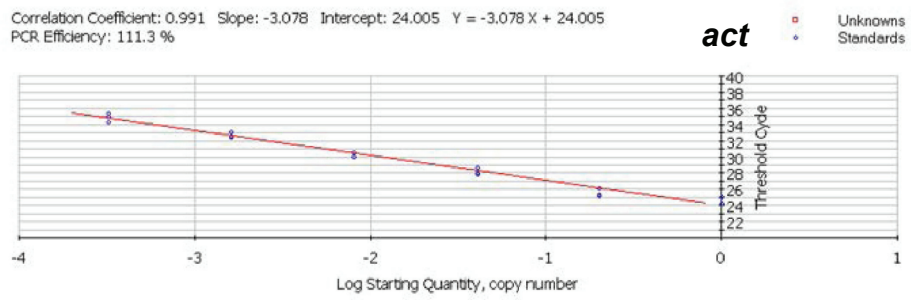


8. Anexo

8.4. Medidas, geles y gráficas de la RT-QPCR (cont.)



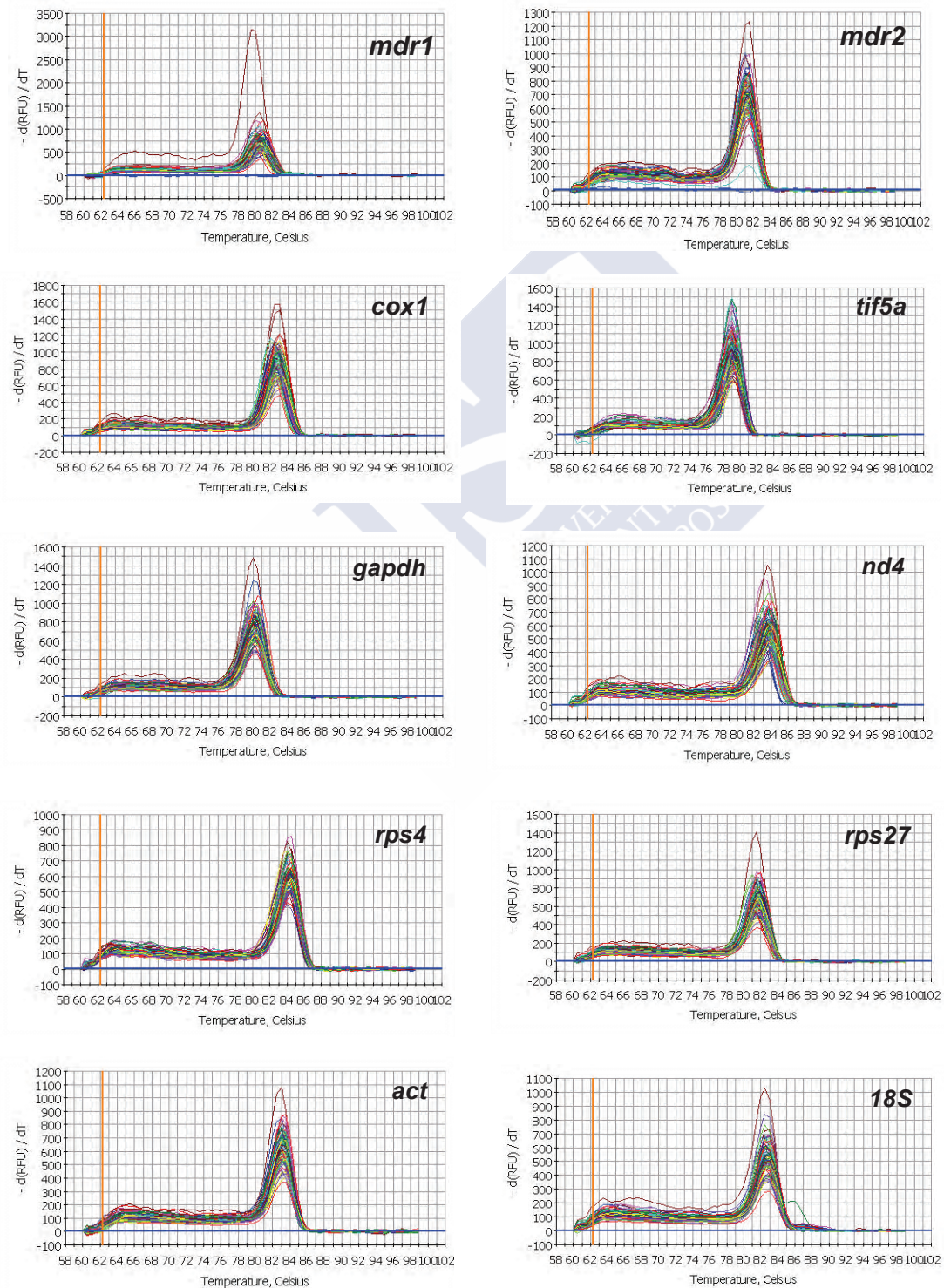
8. Anexo



8. Anexo

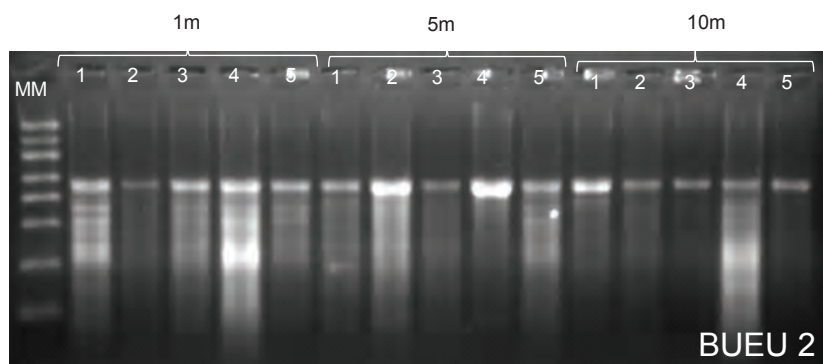
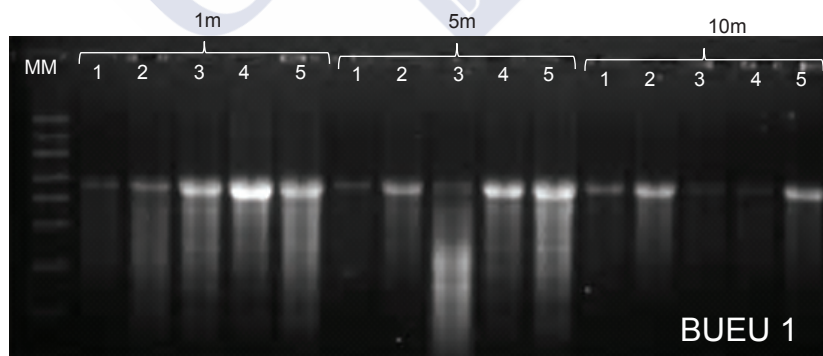
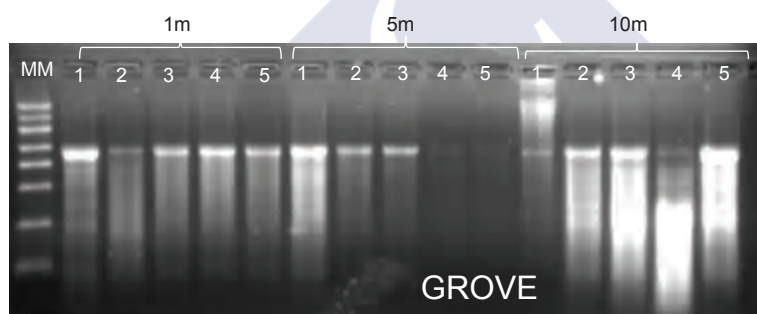
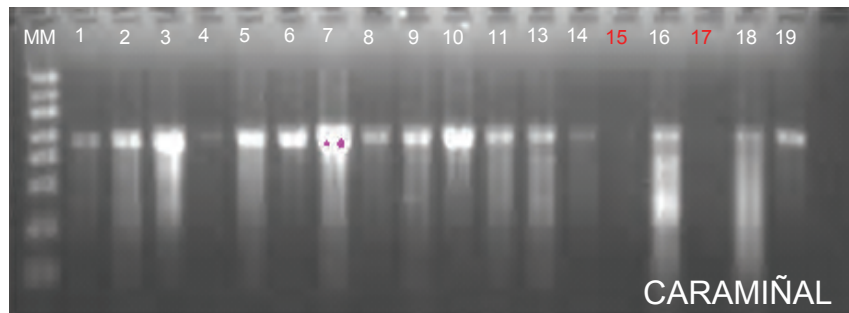
8.4. Medidas, geles y gráficas de la RT-QPCR (cont.)

Figura con el análisis de las curvas de fusión de los distintos genes en la branquia. Las curvas han sido generadas con el Bio-Rad iCycler iQ™ software.



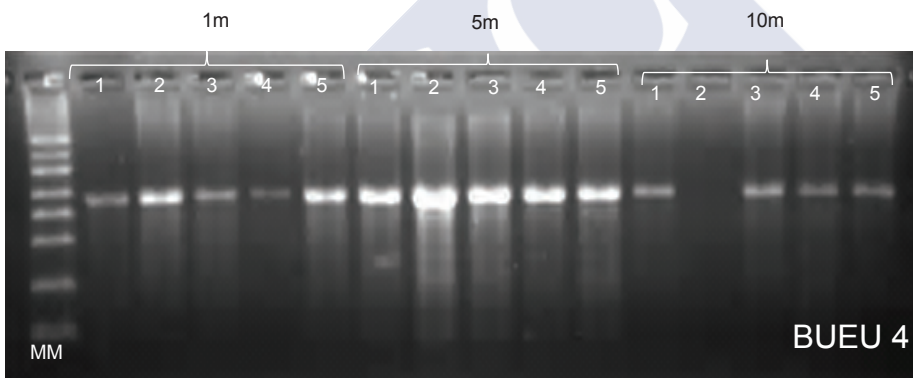
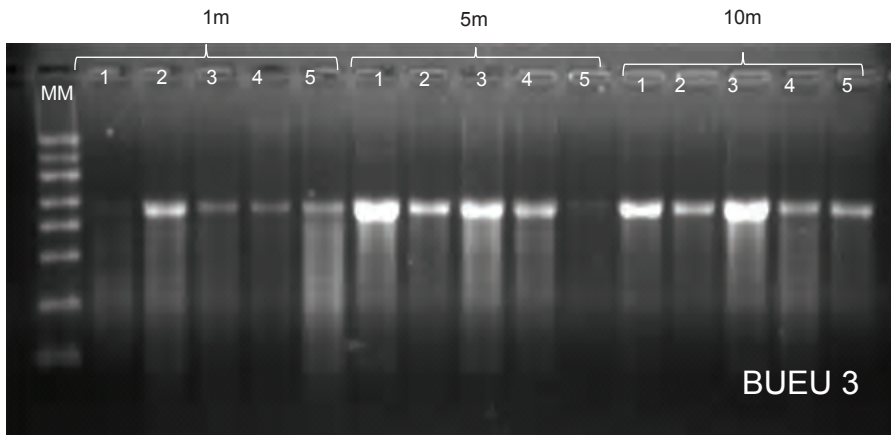
8. Anexo

Geles desnaturalizantes para comprobar el estado de los RNA totales, tras la extracción, en muestras de manto, de *M. galloprovincialis*. M: marcador de RNA *RiboRuler™ High Range RNA Ladder* (Fermentas). En rojo, muestras que presentan un RNA degradado o con baja concentración, en las que fue preciso repetir su extracción.

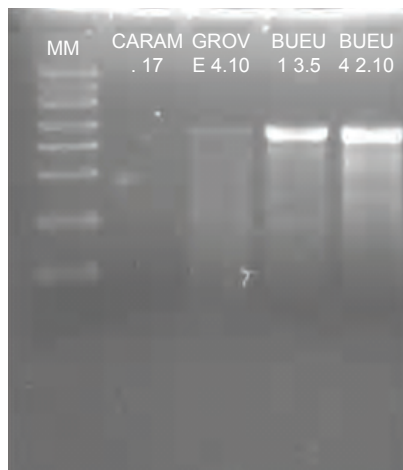


8. Anexo

8.4. Medidas, geles y gráficas de la RT-QPCR (cont.)



Geles desnaturalizantes de las muestras degradadas o con baja concentración.



8. Anexo

Concentración de RNA (ng/ μ L) medida con el NanoDrop, de las muestras de manto de mejillón (*M. galloprovincialis*). C: Muestras control procedentes de A Pobra do Caramiñal (Ría de Arousa). G: Muestras recogidas en O Grove (Ría de Arousa). BU: Muestras recogidas en Bueu (Ría de Pontevedra), a los dos (1-BU), diez (2-BU), dieciséis (3- BU) y setenta y dos días (4- BU) del inicio del episodio tóxico. Muestras según la profundidad: 1m, 5m y 10m.

MANTO											
MUESTRA	[RNA] ng/ μ l	A260/280	A260/230	MUESTRA	[RNA] ng/ μ l	A260/280	A260/230	MUESTRA	[RNA] ng/ μ l	A260/280	A260/230
C1	145,03	1,98	1,91	1-BU1_1m	188,14	2	1,93	3-BU1_1m	127,1	1,99	1,85
C2	330,59	2,06	2,1	1-BU2_1m	729,7	2,04	2,18	3-BU2_1m	324,34	2,02	2,12
C3	136,42	1,92	1,82	1-BU3_1m	893,59	2,03	2,1	3-BU3_1m	214,57	1,85	2,3
C4	191,14	1,82	2,15	1-BU4_1m	784,2	2,05	2,21	3-BU4_1m	242,32	1,84	2,16
C5	349,82	1,99	1,95	1-BU5_1m	1149,81	2,06	2,25	3-BU5_1m	245,03	2,03	2,21
C6	307,39	2	2,04	1-BU1_5m	144,96	1,95	2,06	3-BU1_5m	405,48	2,01	2,15
C7	804,02	2,06	2,17	1-BU2_5m	321,9	1,98	2,15	3-BU2_5m	215,58	1,65	1,76
C8	265,33	2,02	1,97	1-BU3_5m	314,44	2,02	2,12	3-BU3_5m	421,73	2,05	2,18
C9	429,7	1,92	2,22	1-BU4_5m	579,5	2,07	2,17	3-BU4_5m	411,09	2,01	2,16
C10	341,22	1,95	2,15	1-BU5_5m	1368,86	2,03	2	3-BU5_5m	242,02	1,81	2,26
C11	407,52	2,01	2,04	1-BU1_10m	321,42	1,89	2,36	3-BU1_10m	218,45	1,98	2,06
C13	317,54	2,02	2,08	1-BU2_10m	381,82	2,02	2,13	3-BU2_10m	158,26	1,92	2,05
C14	299,6	2	2,01	1-BU3_10m	299,36	1,85	2,33	3-BU3_10m	324,44	2,01	2,17
C15	84,87	1,96	1,76	1-BU4_10m	141,46	2	1,94	3-BU4_10m	242,66	2	2,06
C16	21,36	1,74	0,93	1-BU5_10m	442,73	1,92	2,23	3-BU5_10m	340,21	1,9	2,21
C17	495,09	2,1	2,22	2-BU1_1m	567,9	2,07	2,18	4-BU1_1m	322,74	1,93	2
C18	395,18	2,02	2,11	2-BU2_1m	295,17	1,9	2,26	4-BU2_1m	216,09	2,03	2,02
C19	113,49	1,94	1,74	2-BU3_1m	508,28	2,08	2,18	4-BU3_1m	157,48	1,89	2,02
G1_1m	396,6	2,02	2,14	2-BU4_1m	940,65	2,06	2,22	4-BU4_1m	312,1	2,07	2,07
G2_1m	508,29	2,04	2,1	2-BU5_1m	276,9	2,03	2,15	4-BU5_1m	167,52	2,01	2,06
G3_1m	296,74	2,01	2,09	2-BU1_5m	361,04	2,01	2,13	4-BU1_5m	247,16	1,98	1,96
G4_1m	331,43	2,03	2,12	2-BU2_5m	525,61	2,1	2,18	4-BU2_5m	808,06	2,02	2,11
G5_1m	362,02	2,02	2,13	2-BU3_5m	253,45	2,01	2,02	4-BU3_5m	304,4	1,99	2,08
G1_5m	403,79	1,99	2,12	2-BU4_5m	393,75	1,98	2,17	4-BU4_5m	228,01	2,01	2,04
G2_5m	229,28	1,92	1,99	2-BU5_5m	448,15	1,94	2,27	4-BU5_5m	280,47	2,01	2,13
G3_5m	150,27	1,92	2,11	2-BU1_10m	273,79	2,05	2,13	4-BU1_10m	192,64	1,77	1,77
G4_5m	63	1,96	1,67	2-BU2_10m	303,77	1,89	2,3	4-BU2_10m	533,92	2,02	1,96
G5_5m	104,01	1,76	1,75	2-BU3_10m	168,64	1,96	2,1	4-BU3_10m	175,55	2	1,98
G1_10m	169,16	1,74	1,93	2-BU4_10m	1035,61	2,06	2,19	4-BU4_10m	189,32	1,78	1,68
G2_10m	634,62	2,08	2,1	2-BU5_10m	183,67	1,88	2,24	4-BU5_10m	208,06	1,9	1,34
G3_10m	951,21	2,08	2,17								
G4_10m	116,47	1,95	1,88								
G5_10m	1280,58	2,05	2,15								

8. Anexo

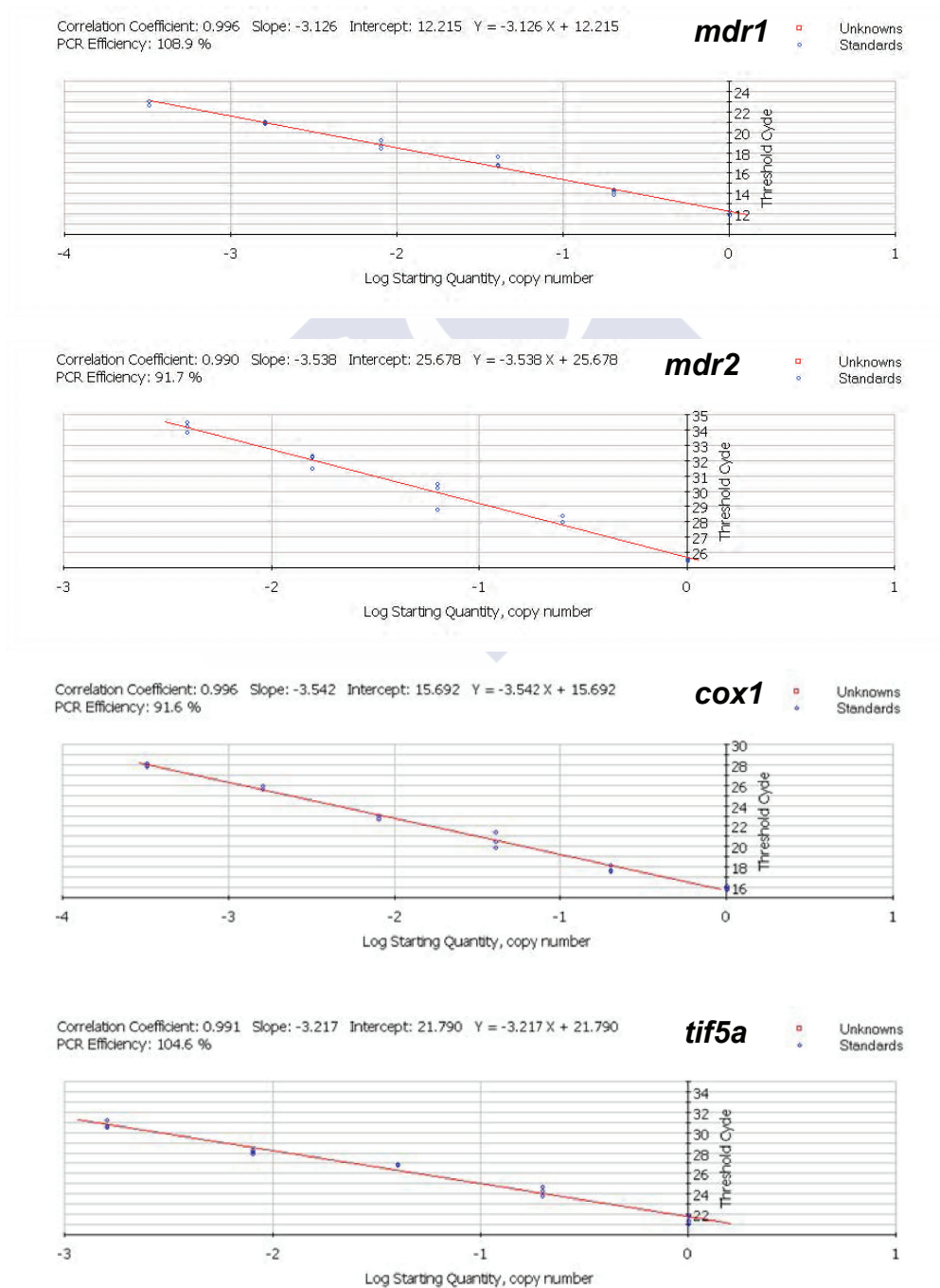
8.4. Medidas, geles y gráficas de la RT-QPCR (cont.)

Medidas de Cq y eficiencia, obtenidas con el iCycler en manto de mejillón (*M. galloprovincialis*). C: Muestras control procedentes de A Pobra do Caramiñal (Ría de Arousa). G: Muestras recogidas en O Grove (Ría de Arousa). B: Muestras recogidas en Bueu (Ría de Pontevedra), a los dos (B.1), diez (B.2), dieciséis (B.3) y setenta y dos días (B.4) del inicio del episodio tóxico. Muestras según la profundidad: 1m, 5m y 10m.

		Manto																	
MUESTRA		nd4	gapdh	cox1	rps27	tif5a	rps4	act	18S			nd4	gapdh	cox1	rps27	tif5a	rps4	act	18S
CONTROL - SIN TOXINA. (CARAMIÑAL)	C 1	21	22.8	16.9	20.5	22.6	19.7	23	20.9	BUEU 2. (10 DÍAS)	B 2.1.1	18.4	24.8	15.6	21.3	22.9	21.3	25.6	20.3
	C 2	18.9	21.4	16.8	18.1	21.6	19.2	21.4	20.7		B 2.2.1	24.1	21.9	21.2	21.1	22.8	20.1	24.5	21.9
	C 3	25.6	21.5	17.6	19.4	19.5	18.3	21.2	21.5		B 2.3.1	18.6	22.9	15.6	21.4	22.2	19.4	22.9	20.5
	C 4	27	23.8	21.8	21.7	23.9	21.6	24	24.5		B 2.4.1	18.9	22.5	17.5	22.1	22.3	20.5	24.4	20.7
	C 5	25.9	22	17.9	20.1	22.5	19.7	20.9	20.8		B 2.5.1	20.1	21.2	16.5	20.9	21.8	19.8	23.1	20.9
	C 6	25.5	21	17.9	19.1	20.6	18.5	21.2	20.7		B 2.1.5	23.9	23.1	14.9	19.9	21.8	21	25.1	20.3
	C 7	21.7	22.6	18.2	19.2	21.1	19.4	21	22.2		B 2.2.5	18.7	21.9	16.3	20.9	21.9	19.5	22.4	20.8
	C 8	24.6	23.7	18	21.1	22.6	20.7	23.2	21.4		B 2.3.5	18.9	23.1	15.8	20.7	22.7	20.9	25	20.2
	C 9	26	21.6	18.7	19.4	22.8	18.8	21.8	21		B 2.4.5	24	20.5	14.6	22.1	21.9	18.3	21.7	19.3
	C 10	24.8	20.7	17.6	19.2	21.5	18.9	21.9	21.2		B 2.5.5	26.1	20.7	19	19.4	21.9	19.5	24.7	19.7
	C 11	23	20	15.3	17.9	20.2	18.4	19.2	19.2		B 2.1.10	18.9	21.1	15.8	17.9	21.3	19.3	21.5	20.7
	C 13	18.8	23.3	16.5	21.5	22.3	21	22.9	20.7		B 2.2.10	24.8	20.7	19	20.7	21.3	19	22	21.9
	C 14	25.7	24.8	19	24.4	29.3	21.3	22.9	21.9		B 2.3.10	26.4	21.1	18.9	20.7	21.4	19.2	22.4	21.8
	C 15	24.7	19.7	16.8	18.6	21.1	18.9	20	22.5		B 2.4.10	19.6	24.2	15.5	23.6	27.8	22	26.7	21.7
	C 16	19.7	23.5	16.5	22.9	23.6	22.7	24.4	20		B 2.5.10	25	23.3	18.2	20.7	21.8	19.4	22.1	22
	C 17	25.2	22.1	17.9	21.6	22.7	20.2	24.5	23.7		B 3.1.1	21.6	21.1	17.5	18.1	22.7	19.2	24.7	20.9
	C 18	19.7	23.6	16.3	20.3	22.4	19.8	23.8	22.2		B 3.2.1	19	22.2	15.9	18.5	22.3	19	22.3	21.2
	C 19	25.3	21.8	17.9	21.8	24.9	20.5	22.5	22.1		B 3.3.1	21.3	21.7	18.1	20.2	21	19.1	21.7	22.1
	O GROVE (0 DÍAS)	G 1.1	24.6	22.9	16.4	21.7	22.5	20.2	24.3		22.1	B 3.4.1	21.7	19.8	19.3	20.2	21.8	19	23.6
G 2.1		25.2	22	17.1	19.4	23.2	19.6	22.3	22.4	B 3.5.1	24.3	22.8	14.8	22.5	23.1	20.3	27	21.8	
G 3.1		24.5	20.8	16.9	18.4	22.3	20.3	21.3	20.9	B 3.1.5	24.9	20.5	17.6	21	21.8	19.1	21.4	21.1	
G 4.1		24.7	21.7	17.1	18.8	20.9	19.2	21	21.8	B 3.2.5	24.5	20.9	17.6	20.7	21.8	18.6	21	22.9	
G 5.1		24	20.9	16.7	19	20.2	18.5	20.9	19.8	B 3.3.5	18.4	20.5	16.1	19.7	21	18.7	21.9	20.6	
G 1.5		26.1	20.9	18.2	20.1	21	19.7	21.9	20.8	B 3.4.5	18.8	20.2	15.1	19.6	20.8	18.9	21.7	19.7	
G 2.5		26.3	20.5	17.9	19.8	21.6	18.1	21.3	22.5	B 3.5.5	26.7	22	20.9	22	22.8	21.1	24.2	22.4	
G 3.5		22	19.8	19.4	19.7	21	19	22.3	21.6	B 3.1.10	24.3	21.2	16.9	20.5	22.6	18.7	21.8	22.1	
G 4.5		28.1	26.2	20.8	23.1	28.1	22.6	26.7	22.7	B 3.2.10	20.2	21	18	18.7	21.4	18.1	20.9	21.2	
G 5.5		24.3	24.5	21.2	24.1	25.4	22.7	25.1	24.4	B 3.3.10	19.2	19.7	16	19.4	21.1	18	20.7	19.6	
G 1.10		27.5	23	21.9	22	24.5	21	24.7	25.2	B 3.4.10	20	20.9	16.3	22.8	22.2	20.8	23.9	21	
G 2.10		24.1	23	15.5	21.3	22	21.2	23.9	19.9	B 3.5.10	26.6	20.6	17.3	19.1	19.7	18.5	21.5	21.2	
G 3.10		21.6	22.8	16.4	22.2	24	22.5	24.3	21.2	B 4.1.1	25.4	20.7	16.8	22.2	24.5	18.1	19.5	21.3	
G 4.10	24.4	25.2	18	23.4	25.4	22.6	29.6	21	B 4.2.1	24.3	19.8	16.8	19.7	20.3	18	20.2	20.7		
G 5.10	19.2	24.5	15.7	20.8	23.8	21.7	24.9	22	B 4.3.1	24.4	22.1	18.2	21	22	19.9	21.5	22		
BUEU 1. (2 DÍAS)	B 1.1.1	23.7	22.8	16.4	20.5	23.8	20.9	23.6	21	B 4.4.1	25.4	21.3	17.7	19.9	21.5	18.7	20.8	20.7	
	B 1.2.1	23.4	21.7	16.1	20.6	21.7	19.8	22.4	21.3	B 4.5.1	23.7	19.9	15.7	19.5	21	18.5	18.7	20	
	B 1.3.1	19.1	23.6	15.8	21	21.1	19.4	23.4	19.3	B 4.1.5	19.5	20.9	16.3	19.9	20.5	18.6	20.1	20.9	
	B 1.4.1	23	21	14.3	19.2	20.1	18.6	20.3	19.7	B 4.2.5	23.9	21.6	15.9	21.3	21.7	20.1	22.5	20.9	
	B 1.5.1	18.4	21.2	15.5	19.5	20.9	19.3	22.7	19.4	B 4.3.5	20.1	23.1	17.4	21.1	21.9	19.6	23.4	20.7	
	B 1.1.5	26.2	21.2	18.5	19.5	20.9	19.4	22.6	20.6	B 4.4.5	23	20.1	15.7	20.6	21.7	18.7	22.4	20.3	
	B 1.2.5	21.4	19.2	17.9	20.1	21.5	18.3	23.6	19.2	B 4.5.5	17.7	21.3	15	20.7	22.1	18.7	21.3	19.9	
	B 1.3.5	24	21.6	14.9	18.7	22.9	19.2	23.4	19.5	B 4.1.10	22.2	21.2	18.9	19.8	21.7	18.8	21.9	22.4	
	B 1.4.5	25	19.2	17.7	19.7	20.6	18	21.9	20.5	B 4.2.10	24.4	21.3	17	20.3	21	18.7	21	20.3	
	B 1.5.5	25	22.8	15.9	18.8	22.9	20.3	23.6	21.5	B 4.3.10	22.5	20.9	15.5	21.8	21.4	18.8	21.3	20.9	
	B 1.1.10	21.3	20.6	18.6	21.2	22.6	19.7	22.6	22.9	B 4.4.10	25.2	22.6	20	23.9	23.8	20.6	23	22.4	
	B 1.2.10	25.6	21.1	16.5	17.9	27	18.3	21.6	20.6	B 4.5.10	23.4	20.1	16.6	18.1	20.7	18.2	20.4	21.1	
	B 1.3.10	26.2	20.9	21.2	19.5	21.7	19.5	23.7	21.9	Eficiencia	1.009	0.961	0.916	0.973	1.05	0.958	1.003	0.94	
	B 1.4.10	24.7	21.7	16.7	21.4	27.6	20.5	22.5	21.5										
	B 1.5.10	25.2	19.6	16.9	19.8	20.4	18.2	20.6	20.1										

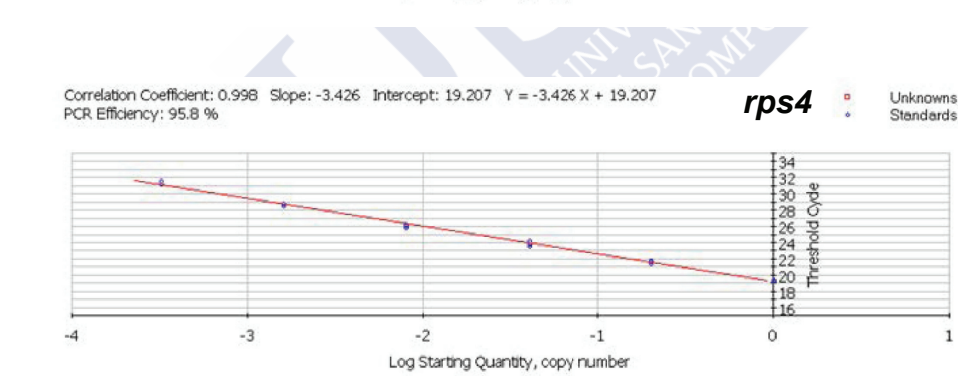
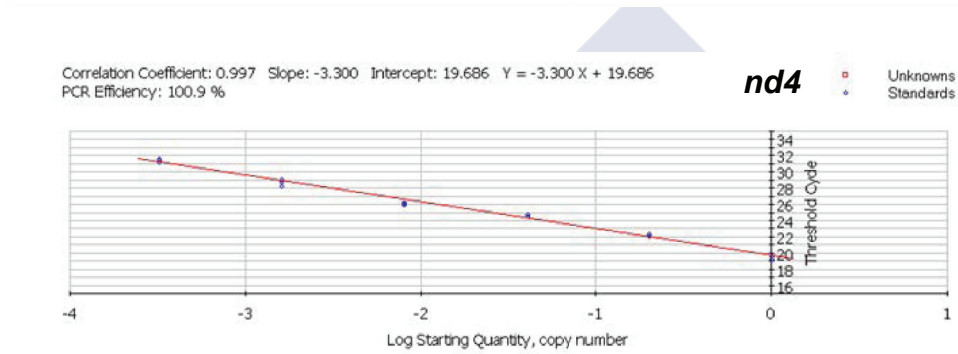
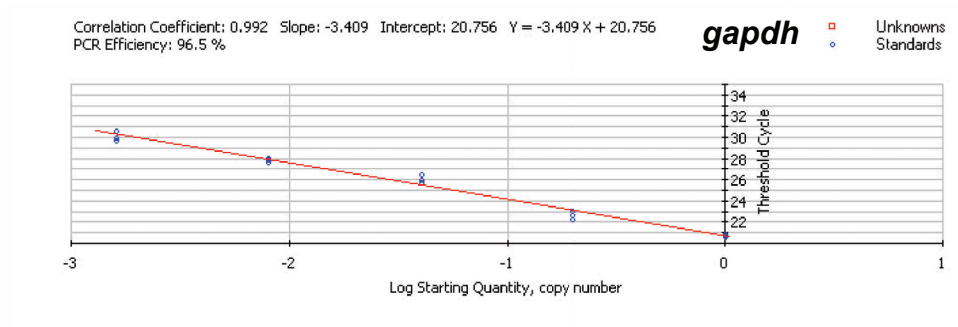
8. Anexo

Figura con las curvas estándar de la RT-qPC de los distintos genes en el manto. Las curvas han sido generadas con el Bio-Rad iCycler iQ™ software. Se representan los valores del Cq (ciclo de cuantificación o ciclo umbral; threshold cycle) de cada conjunto de diluciones seriadas frente al logaritmo del factor de dilución del cDNA. La eficiencia de la reacción (E%) viene dada por $[10 (1/S) - 1] \times 100$, donde S representa la pendiente (slope) de la recta de la regresión lineal.



8. Anexo

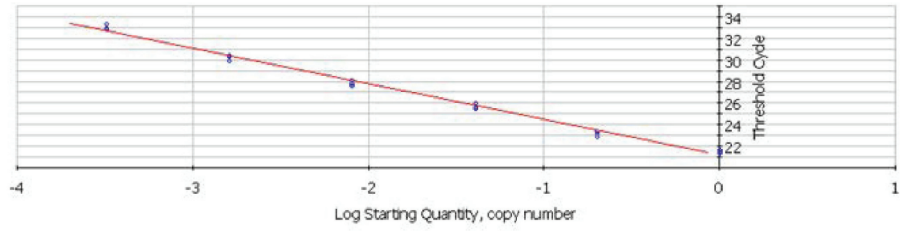
8.4. Medidas, geles y gráficas de la RT-QPCR (cont.)



8. Anexo

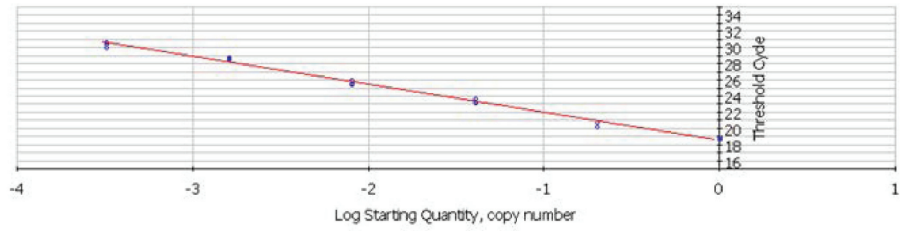
Correlation Coefficient: 0.996 Slope: -3.314 Intercept: 21.169 $Y = -3.314 X + 21.169$
PCR Efficiency: 100.3 %

act  Unknowns
Standards



Correlation Coefficient: 0.996 Slope: -3.475 Intercept: 18.514 $Y = -3.475 X + 18.514$
PCR Efficiency: 94.0 %

18S  Unknowns
Standards



8. Anexo

8.4. Medidas, geles y gráficas de la RT-QPCR (cont.)

Figura con el análisis de las curvas de fusión de los distintos genes en el manto. Las curvas han sido generadas con el Bio-Rad iCycler iQ™ software.

