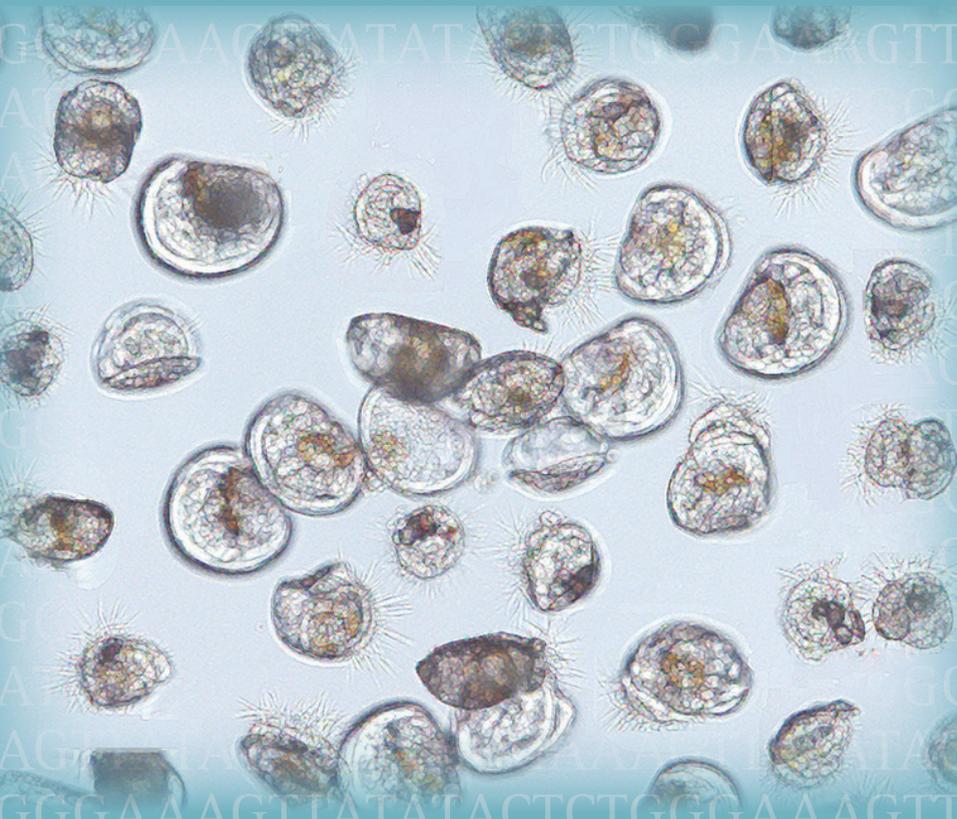


Universidade de Vigo

A microscopic image showing numerous larvae of the mussel Mytilus galloprovincialis. The larvae are small, oval-shaped organisms with a complex internal structure, including a prominent nucleus and various organelles. They are scattered across the field of view, some appearing to be in different stages of development. The background is a light, slightly textured surface.

**Estudio de genes involucrados en
procesos de muerte celular apoptótica y
desarrollo larvario en mejillón
(*Mytilus galloprovincialis*)**

Noelia Estévez Calvar

TESIS DOCTORAL 2013

Portada: Larvas de mejillón en varios estadios de desarrollo

Autores de la fotografía: Dr. Alejandro Romero Jódar y Rubén Chamorro Valverde

Diseño de la portada: Noelia Estévez Calvar

Contraportada: Caída de las hojas de un árbol en otoño en analogía al proceso apoptótico

Diseño de la contraportada: Noelia Estévez Calvar

UniversidadeVigo

**ESTUDIO DE GENES INVOLUCRADOS EN
PROCESOS DE MUERTE CELULAR APOPTÓTICA
Y DESARROLLO LARVARIO EN
MEJILLÓN (*Mytilus galloprovincialis*)**

**Memoria de tesis presentada por Noelia Estévez Calvar
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Vigo**

Programa de Doctorado de Acuicultura

UNIVERSIDAD DE VIGO 2013

UniversidadeVigo

**STUDY OF GENES INVOLVED IN
APOPTOTIC CELL DEATH PROCESSES AND
LARVAL DEVELOPMENT
IN MUSSEL (*Mytilus galloprovincialis*)**

Thesis submitted by Noelia Estévez Calvar

for the degree of Doctor of the University of Vigo

Doctoral Degree Program in Aquaculture

UNIVERSITY OF VIGO 2013

Dña. BEATRIZ NOVOA GARCÍA, Doctora en Biología e Investigadora Científica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), junto con **D. ALEJANDRO ROMERO JÓDAR**, Doctor en Biología y Técnico Especialista del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y **D. ANTONIO FIGUERAS HUERTA**, Doctor en Biología y Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

INFORMAN:

Que la presente memoria adjunta, titulada "ESTUDIO DE GENES INVOLUCRADOS EN PROCESOS DE MUERTE CELULAR APOPTÓTICA Y DESARROLLO LARVARIO EN MEJILLÓN (*Mytilus galloprovincialis*)" presentada por **Dña. Noelia Estévez Calvar** para optar al grado de Doctor por la Universidad de Vigo, ha sido realizada bajo nuestra dirección y, reúne los requisitos necesarios para ser defendida ante el tribunal calificador.

Y para que así conste, se firma la presente en Vigo, a 23 de mayo de 2013

Fdo. Dra. Beatriz Novoa García

Fdo. Dr. Alejandro Romero Jódar

Fdo. Dr. Antonio Figueras Huerta

Visto bueno el tutor en la Universidad de Vigo: **D. José Luis Soengas Fernández**

La realización del presente trabajo ha sido posible gracias a la adjudicación de un contrato JAE-Tec de dos años de duración otorgado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) a disfrutar en el Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo, desde el 25 de mayo de 2009 hasta el 24 de mayo de 2011.

CONTENIDOS

PRÓLOGO	15
INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS	23
Introducción general	25
El mejillón <i>Mytilus galloprovincialis</i>	25
La acuicultura de moluscos bivalvos	27
Las limitaciones de la acuicultura	31
El sistema inmune de los moluscos bivalvos	34
Mecanismos de ataque a la membrana	35
Los hemocitos y su papel central en el sistema inmune innato	36
La muerte celular y su significado fisiológico en vertebrados	43
La necrosis	44
La autofagia	44
La piroptosis	45
La oncosis	45
La apoptosis	45
Mecanismos de señalización apoptótica	48
Mecanismo extrínseco	49
Mecanismo intrínseco o mitocondrial	50
La apoptosis en invertebrados	54
La apoptosis en moluscos	60
Objetivos	63
CAPÍTULO I. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LAS MOLÉCULAS FORMADORAS DE POROS EN LA RESPUESTA INMUNE Y DESARROLLO DEL MEJILLÓN	67
I.1 INTRODUCCIÓN	69
I.2 MATERIAL Y MÉTODOS	74
I.2.1 Animales	74
I.2.2 Amplificación de secuencias mediante RACE	74
I.2.3 Análisis estructural y filogenético	75
I.2.4 Diseños experimentales para análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa	76
I.2.4.1 Patrón de expresión de genes durante el desarrollo larvario	77
I.2.4.1A. Estadios de desarrollo del mejillón	78
I.2.4.1B. Expresión génica	79
I.2.4.2 Análisis de la expresión constitutiva en tejidos	80
I.2.4.3 Perfil de expresión génica en larvas infectadas	81
I.2.4.4 Perfil de expresión génica en mejillones adultos expuestos a diferentes estímulos	82
I.2.4.4.A. Estimulación <i>in vivo</i>	82
I.2.4.4.B. Estimulación <i>in vitro</i>	82
I.3 RESULTADOS	83
I.3.1 Amplificación de las secuencias mediante RACE	83
I.3.2 Análisis estructural y filogenético	83
I.3.3 Patrón de expresión de genes durante el desarrollo larvario	89
I.3.3.1 Estadios de desarrollo del mejillón	89
I.3.3.2 Expresión génica por PCR cuantitativa	91
I.3.4 Análisis de la expresión constitutiva en tejidos	92
I.3.5 Perfil de expresión génica en larvas infectadas	93
I.3.6 Perfil de expresión génica en mejillones adultos expuestos a diferentes estímulos	94
I.3.6.1 Estimulación <i>in vivo</i>	94

I.3.6.2 Estimulación <i>in vitro</i>	96
I.4 DISCUSIÓN.....	99
CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE CASPASAS EN MEJILLÓN FRENTE A DIVERSOS ESTIMULOS	107
II.1 INTRODUCCIÓN	109
II.2 MATERIAL Y MÉTODOS	116
II.2.1 Obtención y mantenimiento de los animales de estudio.....	116
II.2.2 Obtención de secuencias completas de caspasa mediante la técnica RACE.....	116
II.2.3 Caracterización de secuencias de caspasa.....	117
II.2.4 Análisis filogenético	118
II.2.5 Análisis de expresión en tejidos.....	118
II.2.6 Inducción de apoptosis mediante tratamiento con luz ultravioleta.....	120
II.2.7 Evaluación del proceso apoptótico mediante microscopía óptica	120
II.2.8 Evaluación del proceso apoptótico por citometría de flujo	120
II.2.9 Modulación de la expresión de las caspasas tras la exposición a luz ultravioleta	121
II.2.10 Modulación de la expresión de caspasas bajo diferentes estímulos.....	122
II.2.10.1 Estimulación <i>in vitro</i> con PAMPs.....	122
II.2.10.2 Estimulación <i>in vitro</i> con compuestos organoclorados.....	122
II.3 RESULTADOS.....	123
II.3.1 Caracterización de secuencias de caspasa.....	123
II.3.2 Análisis filogenético	127
II.3.3 Análisis de expresión en tejidos.....	129
II.3.4 Inducción de apoptosis mediante tratamiento con luz ultravioleta.....	130
II.3.4.1 Evaluación del proceso apoptótico mediante microscopía óptica	130
II.3.4.2 Evaluación del proceso apoptótico por citometría de flujo	131
II.3.5 Modulación de la expresión de las caspasas tras la exposición a luz ultravioleta	132
II.3.6 Modulación de la expresión de caspasas bajo diferentes estímulos	134
II.3.6.1 Estimulación <i>in vitro</i> con PAMPs	134
II.3.6.2 Estimulación <i>in vitro</i> con compuestos organoclorados.....	137
II.4 DISCUSIÓN	138
CAPÍTULO III. IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN EL MECANISMO APOPTÓTICO MITOCONDRIAL EN <i>Mytilus galloprovincialis</i>.....	145
III.1 INTRODUCCIÓN.....	147
III.2 MATERIAL Y MÉTODOS	156
III.2.1 Animales de estudio	156
III.2.2 Selección de secuencias y amplificación por técnica RACE	156
III.2.3 Caracterización estructural y filogenética.....	157
III.2.4 Inducción y evaluación de la apoptosis en hemocitos de mejillón	158
III.2.5 Implicación del ROS en la apoptosis inducida por luz ultravioleta en hemocitos de mejillón.....	158
III.2.5.1 Evaluación de la toxicidad de los antioxidantes NAC y PDTC	158
III.2.5.2 Producción de ROS en presencia de compuestos antioxidantes.....	159
III.2.6 Efecto de la luz ultravioleta sobre la modulación de la maquinaria central apoptótica.....	160
III.2.6.1 Evaluación de la toxicidad de los compuestos inhibidores	160
III.2.6.2 Evaluación de los niveles de apoptosis en presencia de los compuestos inhibidores PFT- α , CsA y Z-VAD-FMK.....	160
III.2.6.3 Análisis de la expresión de genes apoptóticos usando PCR cuantitativa	161
III.2.7 Análisis estadístico	162
III.3 RESULTADOS	163
III.3.1 Caracterización estructural y filogenética.....	163
III.3.1.1 El gen p53.....	163
III.3.1.2 La proteína PDRP	165

III.3.1.3 La familia de proteínas Bcl-2	166
III.3.1.4 La proteína BI-1	168
III.3.1.5 La proteína DffA	170
III.3.2 Inducción y evaluación de la apoptosis en hemocitos de mejillón	171
III.3.3 Implicación del ROS en la apoptosis inducida por luz ultravioleta en hemocitos de mejillón	174
III.3.3.1 Evaluación de la toxicidad de los antioxidantes NAC y PDTC	174
III.3.3.2 Producción de ROS en presencia de compuestos antioxidantes	175
III.3.3.3 Efecto de los antioxidantes en los niveles de apoptosis	175
III.3.4 Efecto de la luz ultravioleta sobre la modulación de la maquinaria central apoptótica	176
III.3.4.1 Evaluación de la toxicidad de los compuestos inhibidores PFT- α , CsA y Z-VAD-FMK	176
III.3.4.2 Evaluación de los niveles de apoptosis en presencia de los compuestos inhibidores	178
III.3.4.3 Análisis de la expresión de genes apoptóticos usando PCR cuantitativa	180
III.4 DISCUSIÓN	182
CONCLUSIONES GENERALES	189
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	191
AGRADECIMIENTOS	241

PRÓLOGO

La acuicultura es una actividad de gran importancia socioeconómica para las áreas costeras de muchos países. Ofrece oportunidades que promueven el empleo y actúan como motor de desarrollo contribuyendo al alivio de la pobreza, reduciendo la sobreexplotación de los recursos naturales costeros y mejorando la seguridad alimentaria. Sin embargo, la gran variedad de enfermedades infecciosas existentes en la actualidad que afectan a instalaciones de cultivos de todo el planeta, ponen en riesgo el crecimiento de la producción acuícola. En este sentido, la adopción de una estrategia basada en la prevención de enfermedades, más que un tratamiento terapéutico, es crucial para la expansión de una actividad acuícola sostenible y compatible con el medio ambiente. Asimismo, una estrategia de esas características es fundamental para lograr la obtención de productos acuícolas saludables al mismo tiempo que garantiza el bienestar de los animales.

En el caso de la acuicultura de moluscos marinos, la actividad acuícola se desarrolla, normalmente, de manera extensiva en el propio medio natural en el que los organismos habitan; por lo que el empleo de antibióticos u otros tratamientos químicos se presenta como inviable, poniendo de manifiesto la absoluta necesidad de desarrollar programas eficientes de prevención de enfermedades para moluscos bivalvos. Estos animales son seres filtradores que viven en una gran variedad de ambientes diversos donde abundan otros organismos de naturaleza comensal, oportunística y patógena compuesta por endoparásitos como *Mytilicola* y *Urastoma*; protozoos como *Bonamia*, *Haplosporidium*, *Marteilia* o *Perkinsus spp*; virus como los herpes-virus o iridovirus y bacterias del género *Nocardia* o *Vibrio*, entre otras. Estos microorganismos pueden mermar las defensas inmunes de los bivalvos durante periodos críticos y producir episodios de mortalidades masivas que llevan asociados grandes pérdidas económicas. Algunos grupos de investigación vienen centrando sus esfuerzos, desde hace varios años, en la búsqueda de estrategias que ayuden a mejorar el estado inmunológico de los moluscos bivalvos frente a las enfermedades, estresantes ambientales o contaminantes de origen antropogénico pero desafortunadamente, el conocimiento actual sobre el funcionamiento del sistema inmune de estos organismos es limitado. El mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) (Lamarck, 1819) a diferencia de otras

especies de bivalvos de interés acuícola como la ostra o la almeja, no se ha visto implicado en eventos de mortalidades a gran escala. Se trata de una especie altamente resistente, capaz de adaptarse a diferentes ambientes y soportar factores externos de diversa índole siendo empleado, frecuentemente, como biomarcador de contaminación ambiental.

La descripción de genes y proteínas que participan de manera activa en las respuestas inmunes, puede aportar información de gran interés acerca de los mecanismos implicados en la protección de los moluscos bivalvos, como el mejillón, frente a factores externos. Varios son los genes relacionados con la defensa inmune identificados en este molusco que presentan una gran similitud respecto a sus homólogos descritos en vertebrados pero, en general, el número de genes caracterizados en bivalvos, en comparación con otros grupos taxonómicos, es muy reducido.

Uno de los procesos que ha sido escasamente investigado en moluscos bivalvos es la apoptosis. La muerte celular programada o apoptosis, consiste en la eliminación de células dañadas o infectadas a través de un proceso considerado vital para el desarrollo embrionario, sistema inmune y mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. Se ha visto que fallos en el mecanismo apoptótico en humanos, conducen al desencadenamiento de enfermedades como el cáncer, Parkinson o Alzheimer. La red apoptótica en moluscos es compleja y presenta características que la convierten en un proceso único respecto a otros organismos. Éstas podrían estar relacionadas con el hecho de que se trate de organismos sedentarios que están continuamente expuestos a cambios ambientales y otros factores de diversa naturaleza. En este sentido, el mejillón mediterráneo es un invertebrado con potencial para ser empleado como modelo animal en el estudio de los mecanismos implicados en las estrategias de defensa, ya sea durante los estadios más tempranos de desarrollo o en organismos en edad adulta.

En el presente trabajo se recogen los resultados obtenidos durante el estudio de identificación y caracterización, tanto desde un punto de vista estructural como funcional, de quince nuevos genes que se expresan activamente a lo largo del desarrollo del mejillón, frente a patógenos, compuestos genotóxicos y estresantes ambientales como contaminantes o radiación ultravioleta.

La presente memoria de tesis incluye una introducción de carácter general cuyo objetivo es delimitar el contexto de los experimentos realizados así como, definir aquellos conceptos considerados de esencial importancia para la comprensión del trabajo en su conjunto.

En el primer capítulo se incluyen los resultados fruto de la descripción de tres nuevos genes: *ApelB*, *ApelP* y *Macp*, jamás descritos en moluscos bivalvos y que están relacionados con la superfamilia del complejo de ataque a la membrana y perforina (MACPF); una de las mayores familias de moléculas formadoras de poros y de la que existen muy pocas referencias en organismos invertebrados. Los estudios funcionales llevados a cabo con estos genes, se basaron en el análisis de expresión de los mismos mediante PCR cuantitativa durante el desarrollo larvario del mejillón (*Mytilus galloprovincialis*). Los resultados desvelaron una regulación positiva específica de cada proteína para cada estadio de desarrollo sugiriendo la implicación de estos genes en el desarrollo larvario del mejillón. Los genes *ApelB* y *ApelP* se expresaron de manera significativa en los estadios de blástula y trocófora, mientras que *Macp* se expresó en el estadio de veliger. La PCR cuantitativa reveló una regulación positiva de los tres genes en varios tejidos infectados con *Vibrio anguillarum* y estimulados con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), de individuos adultos, sugiriendo la participación de estas proteínas en los mecanismos de defensa del mejillón mediterráneo.

En el capítulo II, se describen seis genes pertenecientes a la familia de las caspasas, la cual, se divide en base a una serie de criterios, en dos grupos: caspasas iniciadoras y caspasas ejecutoras. Desde el punto de vista evolutivo las caspasas son proteínas muy conservadas y además juegan un papel crucial en el desencadenamiento de la apoptosis. A pesar de que las caspasas han sido descritas en vertebrados y en invertebrados modelo como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, existen muy pocos trabajos que centren su atención en la caracterización de estas proteínas o incluso en el estudio de la modulación de su expresión a través de diferentes estímulos en moluscos bivalvos. Dentro de las seis caspasas descritas en el presente trabajo, dos de ellas pertenecen al grupo de las caspasas iniciadoras y las cuatro restantes se incluyen en el grupo de las caspasas ejecutoras. Ambos tipos de caspasas poseen características estructurales que las hacen diferentes de otras caspasas previamente descritas en organismos vertebrados e invertebrados.

Los estudios funcionales llevados a cabo, demostraron que existen elevados niveles de expresión de estos genes en la glándula digestiva y las branquias de mejillón; tejidos en los que el proceso apoptótico es altamente activo para la eliminación de células dañadas y el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de los tejidos. En hemocitos se registraron valores significativos de expresión probablemente debido al papel de la apoptosis en la defensa contra patógenos que tiene lugar en estas células. Para poder comprender y analizar los mecanismos de regulación de estos genes, los hemocitos se trataron con luz ultravioleta, PAMPs y contaminantes de naturaleza orgánica. Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación de los niveles de apoptosis mediante técnicas de microscopía, citometría de flujo y PCR cuantitativa. Los resultados obtenidos sugieren que las caspasas de mejillón, se modulan de manera activa frente a patógenos, estresantes ambientales y contaminantes.

En el capítulo III se caracterizan otros seis genes pertenecientes a distintas familias proteicas, implicados en el mecanismo apoptótico mitocondrial. Mediante el empleo de la técnica de citometría de flujo, se estimó la producción de radicales de oxígeno (ROS) en hemocitos de mejillón estimulados con luz ultravioleta. La utilización de diferentes inhibidores apoptóticos sirvió para bloquear algunas de las rutas de señalización implicadas en apoptosis y bajo esas condiciones se midió el nivel de muerte celular programada de los hemocitos.

Los genes caracterizados en mejillón presentaron relaciones filogenéticas más cercanas a sus homólogos en vertebrados que incluso a los presentes en invertebrados. Se observó que los hemocitos de mejillón poseen la capacidad de producir ROS tras su exposición a luz ultravioleta. Dentro de los dos tipos de hemocitos, los granulocitos mostraron una mayor capacidad de producción de ROS, en comparación con los hialinocitos, al igual que ocurre en otras especies de bivalvos. El uso de agentes inhibidores alteró la producción de los niveles de apoptosis, en algunos casos, de manera distinta a lo observado en otros procesos experimentales y/o tipos celulares revelando que, el efecto de los compuestos inhibidores sobre las células de mejillón irradiadas no es universal, siendo altamente dependiente de las condiciones bajo las que se desarrolla el experimento. Además, se demostró mediante PCR cuantitativa, la existencia de una regulación de la expresión génica en hemocitos de mejillón, la cual se moduló activamente en hemocitos irradiados a lo largo de los diferentes puntos de muestreo. El nivel de expresión de los genes apoptóticos

mitocondriales en hemocitos se vio influenciado por el tratamiento de estas células con el reactivo Pifithrin-alpha. En este capítulo, también se incluyó lo que se denomina en este trabajo como "Mapa apoptótico de los moluscos bivalvos". Dicho mapa, incluye todos aquellos genes, con un papel destacado en los mecanismos de señalización apoptótica, descritos hasta la fecha en estos organismos. Se trata de una hoja de ruta que pone de manifiesto los logros alcanzados en el estudio de la apoptosis en moluscos, pero que a la vez, deja constancia de la necesidad de seguir investigando en este campo, dada la gran cantidad de genes que quedan por caracterizar y que suponen piezas clave para entender el complejo entramado que constituye la apoptosis.

“El agua fluye, las piedras permanecen...”

Antiguo proverbio rumano

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN GENERAL

EL MEJILLÓN *Mytilus galloprovincialis*

Los antiguos autores griegos y latinos designaban a los mejillones o formas afines bajo el nombre de <<μυτίλος>>, <<mitilus>>, <<mytilus>> o <<mitylus>>, término tomado en el año 1554 por Rondelet. En 1758 el género *Mytilus* fue creado por Linné quien le otorgó un sentido amplio. Sucesivamente, otros autores fueron acotando el género hasta reducirlo a las dimensiones actuales (Lubet, 1973).

El mejillón mediterráneo, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), cuyo nombre procede del latín <<mitulus>> y <<galloprovincialis>> o provincia de Galia; es un metazoo perteneciente al phylum Mollusca, el segundo grupo de animales, después de los artrópodos, que presenta una mayor diversidad con cerca de 93.000 especies (Haszprunar, 2001). En el medio natural, los mejillones se localizan principalmente en la zona litoral, adheridos formando clústers sobre varios tipos de sustratos. La distribución de poblaciones naturales de esta especie no está clara puesto que existe confusión en relación a *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) siendo ambas especies difíciles de distinguir en base a su apariencia morfológica. En general, *M. edulis* se encuentra en latitudes más al norte (Escocia, norte y mitad de Inglaterra) mientras que *M. galloprovincialis* suele estar localizado más hacia el sur. A día de hoy, existen dudas sobre qué factores son los que mantienen a las poblaciones de estas especies separadas (Craft y col., 2010). Más concretamente, se tiene constancia de la presencia del mejillón mediterráneo en las costas Mediterráneas de España, Francia e Italia; costa Adriática y Mar Negro y en las costas Atlánticas de la Península Ibérica, en el país galo extendiéndose hasta la región de la Bretaña Francesa e Islas Británicas y norte de África (McDonald y Koehn, 1988; McDonald y col., 1991; Gosling, 1992; Comesaña y col., 1998). El mejillón mediterráneo figura en la Lista de Especies Invasoras UICN, como una especie que se ha propagado a lo largo de aguas de todo el mundo, principalmente de regiones templadas (costa Atlántica de África del Sur, costas Pacífica y Atlántica de América del Norte y costas de Australia, Nueva Zelanda, Tazmania, Japón y este de China) en aquellas localidades donde existen grandes infraestructuras portuarias (Gosling, 1992; Branch y Steffani, 2003). De ahí que la causa más probable de su introducción haya sido la presencia de estos organismos

formando parte del *fouling* del casco de las embarcaciones y las aguas de lastre (Carlton 1992; Geller, 1999; Robinson y Griffiths, 2002). Se teme que en Sudáfrica, el mejillón mediterráneo pueda desplazar a las poblaciones autóctonas del mejillón marrón *Perna perna* (Bownes y McQuaid, 2006).

Los mejillones son organismos de naturaleza filtradora estando funcionalmente ligados a los productores primarios, principalmente fitoplancton y bacterias; y también actúan como acumuladores de calcio y carbono, elementos empleados en la construcción de la concha. Además son considerados como los organismos marinos conversores de nutrientes y materia orgánica a proteína animal nutritiva, más eficientes. Poseen una alta capacidad de adherencia a los sustratos, gracias a la presencia del biso, y por ello, *M. galloprovincialis* constituye una especie ideal para ser empleada en acuicultura usando diferentes sistemas acuícolas. Tal y como afirmaron Bardach y colaboradores (1972), el cultivo de mejillón es la forma de acuicultura de agua de mar más productiva y su proliferación es prácticamente segura. Al igual que la mayoría de organismos bentónicos marinos, presenta un ciclo de vida complejo que incluye un estadio larvario planctónico y un estadio adulto sésil o sedentario. La fecundación es externa de manera que los huevos fecundados se depositan en el fondo del mar donde continúa su desarrollo dando lugar a una serie de estadios larvarios móviles. En las Rías Gallegas (noroeste de España) se han registrado puestas esporádicas de *M. galloprovincialis* durante todo el año aunque el máximo periodo reproductivo se extiende desde inicios de la primavera hasta finales del verano (Andreu, 1958; Andreu, 1965; Villalba, 1995; Cáceres-Martínez y Figueras, 1998a; Suárez y col., 2005; Broitman y col., 2008; García, 2009). Tras la fecundación, se inicia el desarrollo embrionario del mejillón con la formación del cigoto alcanzando, aproximadamente a las 24 horas, el primer estadio larvario de trocófora (Figura 1), caracterizado por la presencia de un par de flagelos centrales y un penacho de cilios. El segundo estadio larvario es el de veliger, en el que la larva está dotada de un velo. Posteriormente, la zona de la charnela adquiere una morfología curva denominándose larva umbonada, la cual evoluciona a forma de D (larva D). Por último, tiene lugar la aparición del pie en el estadio de pediveliger. Esta fase metamórfica indica que los individuos de mejillón, han abandonado los hábitos natatorios para pasar a vivir en el fondo, adhiriéndose al sustrato y alcanzando por tanto un estadio juvenil (Bayne, 1976; Ruiz y col., 2008).

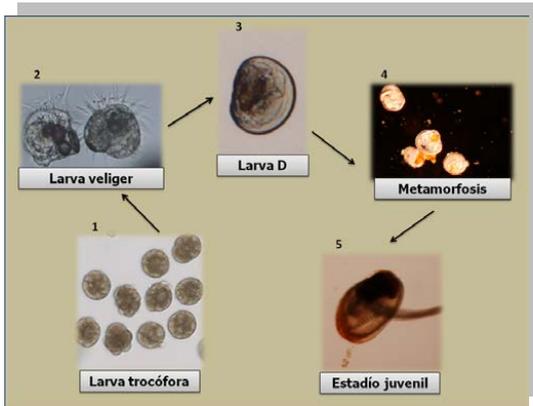


Figura 1. Ciclo larvario del mejillón (*Mytilus galloprovincialis*)

Autores de las fotografías de larvas:

Dr. Alejandro Romero y Rubén Chamorro

El mejillón mediterráneo recibe, desde hace muchos años, una gran atención por parte de la comunidad científica de ámbitos muy diversos, lo que justifica la importancia de esta especie en diferentes campos. Así, son numerosos los estudios existentes sobre la fisiología de estos organismos (Labarta y col., 1997), dinámica poblacional (Cáceres-Martínez y Figueras, 1998a, 1998b, 1998c) inmunología (Costa y col., 2009a, 2009b; Koutsogiannaki y Kaloyianni; 2010; Romero y col., 2011b), acuicultura (Andreu, 1958; Bayne, 1991; Molares y Fuentes, 1995; Villalba, 1995), biomonitorización ambiental (Beiras y His, 1995; Fernández y col., 2010; Scarpato y col., 2010; Moschino y col., 2011), proteómica (López y col., 2002; Tomanek y Zuzow, 2010) o genética de poblaciones (Diz y Presa, 2008, 2009) y biotecnología (Charlet y col., 1996; Tassanakajon y col., 2008; Badiu y col., 2010).

LA ACUICULTURA DE MOLUSCOS BIVALVOS

Los productos acuícolas son una fuente muy importante de alimentación a nivel mundial, tanto en zonas costeras como de interior, constituyendo un valioso aporte de proteínas y nutrientes esenciales (López, 2005; FAO, 2012;). Más de la mitad del total de los alimentos de origen acuático consumidos actualmente por la población mundial, procede de granjas de cultivo (APROMAR, 2012). Este hecho revela la vitalidad de la acuicultura como técnica productiva y demuestra la capacidad de innovación, emprendimiento y aprovechamiento de los recursos disponibles tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Y es en estos últimos donde a pesar de los niveles relativamente inferiores de consumo de productos pesqueros, esta actividad puede desempeñar una función especial en la consecución del aumento de la

seguridad alimentaria y el alivio de la pobreza (López, 2005; APROMAR, 2012; FAO, 2012). Se estima que en el año 2030 más del 65% de los alimentos de origen acuático procederá de la acuicultura (FAO, 2012).



Figura 2. Mariscadoras de moluscos bivalvos en Túnez

Fuente: © FAO/Giulio Napolitano



Figura 3. Recolección de moluscos bivalvos Galicia

Autora de la fotografía: Noelia Estévez Calvar

La acuicultura de moluscos marinos o conchicultura es el tipo de cultivo marino más antiguo del mundo. Vio su nacimiento hace millones de años en las costas del Extremo Oriente (China, Corea y Japón) donde los ribereños enterraban estacas para recoger las ostras y los mejillones que se fijaban sobre ellas. Pero no es hasta el siglo XIX cuando se empieza a trabajar en las tecnologías de cultivo de moluscos. En las figuras 2 y 3 se observa el proceso de recogida de moluscos bivalvos por parte de mujeres tunecinas y gallegas, respectivamente.

El cultivo de mejillón o miticultura se define como una forma extensiva acuícola, totalmente dependiente de los recursos naturales, tanto para la alimentación como reclutamiento, y cuya finalidad es la producción de larvas o juveniles de mejillón para su cría y posterior comercialización empleando para ello las tecnologías que más se adecuen al lugar de cultivo (Lubet y Mathieu, 1999). Las costas francesas de Charentes, fueron la cuna de la miticultura moderna desarrollada en *bouchots*. El país vecino posee con bastante seguridad la mayor tradición de cultivo de mejillón puesto que se tienen indicios de su existencia ya en el año 1235 (Bardach y col., 1972). En la actualidad, el mejillón lidera el cultivo de moluscos bivalvos en Europa alcanzando regularmente las 250.000 toneladas anuales. España es el mayor productor de este bivalvo seguido de Francia e Italia siendo Galicia la región de mayor importancia y

donde se concentra el 90% de la producción total de moluscos bivalvos de nuestro país. La miticultura gallega ha adquirido un protagonismo como referente en el contexto mundial siendo a la vez un importante motor económico de las zonas costeras y del desarrollo endógeno de las economías locales (Franco, 2006).

El sector mejillonero gallego dotado en la actualidad con un número aproximado de 3.337 bateas, produjo en el año 2010, alrededor de 200.000 toneladas (APROMAR, 2012) (Figura 4). La miticultura se lleva a cabo en más de 40 países alrededor del mundo empleando para ello diversas técnicas (Lubet, 1959; Baylon, 1990).

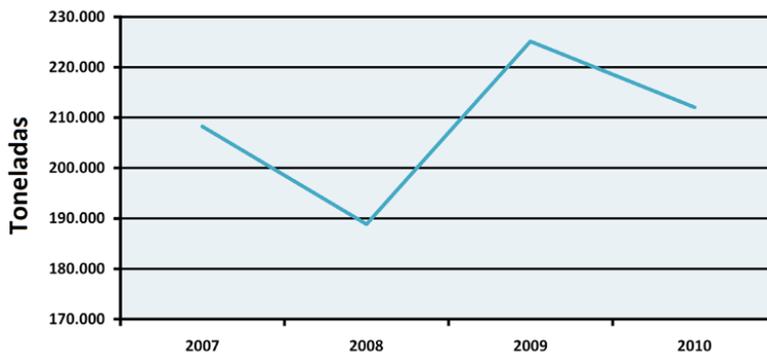


Figura 4. Producción de mejillón en Galicia entre los años 2007-2010

La costa de Galicia se caracteriza por la presencia de Rías; valles fluviales inundados por agua de mar que poseen una amplia boca de agua orientada al mar y que se estrecha hacia el interior. Estas áreas marinas protegidas son óptimas para el cultivo del mejillón y están sometidas de manera estacional a afloramientos o *upwelling* de fitoplancton; un fenómeno natural que ocurre de marzo a octubre (Wooster y col., 1976; Fraga, 1981) y que provee un ambiente ideal para el cultivo de mejillones en bateas de manera extensiva. La batea (Figura 5) se define como un vivero construido con un sistema de flotación hidrodinámico sobre el que se asienta un entramado de madera o *engrellado* de eucalipto con forma rectangular del cual penden un máximo de 500 cuerdas.



Figura 5. Aspecto de una batea típica de la Ría de Vigo

Autora de la fotografía. Noelia Estévez Calvar

Las bateas se localizan juntas, pero separadas unas de otros a uno 80-100 metros, en grupos llamados *parques* (Figura 6) cuya disposición y número están controlados por las autoridades autonómicas.



Figura 6. Parque de bateas en la Ría de Vigo



Figura 7. Embarcación especial para trabajo en bateas

Autora de las fotografías: Noelia Estévez Calvar

Actualmente, los cultivadores trabajan desde embarcaciones anchas de poco calado (Figura 7) equipadas con una cesta y una grúa para levantar las cuerdas y máquinas para separar y ralear los mejillones. Cada batea normalmente sostiene tres tipos de cuerdas: aquellas para recolectar semilla, las que albergan mejillones en crecimiento y las que poseen los mejillones de tamaño comercial. De este modo, los

cultivadores mantienen una producción continua. El método de producción de mejillón se divide en las cuatro etapas siguientes: 1) Toma y fijación de la semilla o *mejilla* 2) Encordado 3) Desdoble o raleo 4) Engorde y recogida del producto.

Tradicionalmente, el mejillón cultivado en Galicia se ha considerado como *Mytilus edulis*. Sin embargo, estudios basados en la morfología del espermatozoide (Crespo y col., 1990), diferencias genéticas en *loci* aloclímicos (Sanjuán y col., 1990; Sanjuán y col., 1996) y en el cariotipo (Martínez-Lage y col., 1992) han llevado a su identificación como *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (Tirado y col., 2005). Además, esta especie, es el primer recurso marino de Europa que posee de manera oficial, desde el año 2007, un reconocimiento relativo a su lugar de origen, las Rías Gallegas, como "Mejillón de Galicia" (Comisión Europea, 2006).

LAS LIMITACIONES DE LA ACUICULTURA

A pesar de que son diversos los factores que pueden limitar el futuro desarrollo de la acuicultura, tales como ubicación inadecuada del cultivo, empleo de malas tecnologías, fuertes densidades de población (que conllevan a una reducción del aporte nutricional), falta de capacidad para producir especies diversas, factores ambientales (periodos prolongados de temperaturas altas o bajas, salinidades extremas) y contaminación; las enfermedades infecciosas constituyen la principal barrera (Lubet y Mathieu, 1999). Las diferentes patologías existentes y que afectan a cultivos, principalmente de carácter intensivo, sin descartar los cultivos extensivos, pueden provocar la disminución de la calidad de los productos cultivados. Así la presencia de bajos índices de condición (Lucas y Beninger, 1985), aparición de anomalías en las valvas o la alta mortalidad de estadios larvarios, juveniles y adultos, son sucesos que conllevan a pérdidas económicas muy importantes (Tirado y col., 2005). Dado que no existen medios de lucha eficaz contra las epidemias más que la erradicación de animales contaminados, una identificación y estudio del desarrollo de la enfermedad así como un rápido diagnóstico de la misma es vital para establecer métodos de prevención en la producción acuícola (Mialhe y col., 1988; Lubet y Mathieu, 1999; Figueras y Novoa, 2011). Agentes patogénicos intracelulares, virus, microorganismos o parásitos son los responsables de estas enfermedades que pueden derivar a posteriori en epizootias (Mialhe y col., 1988). En el año 1976, Comps y colaboradores describieron la existencia de un Iridovirus que causaba mortalidades en poblaciones de ostras adultas portuguesas (*Crassostrea unguolata*). Posteriormente, se comprobó la

presencia de este agente patógeno en estadios larvarios de ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) en Francia y el Oeste de Estados Unidos (Elston y Wilkinson, 1985; Figueras y Montes, 1988). Esta especie, se ha visto gravemente afectada por otro virus, el Herpesvirus, el cual ha provocado mortalidades masivas en diversos lugares como Francia, Nueva Zelanda y California (Marteil, 1976; Hine y col., 1992; Nicolas y col., 1992; Renault y Novoa, 2004; Batista y col., 2007). Sin embargo, las enfermedades más importantes de moluscos bivalvos conocidas hasta ahora, están causadas por protozoos algunos de los cuales han sido incluidos en la Lista OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) para su control a nivel mundial. Así es el caso de *Bonamia ostreae* y *Bonamia exitiosa*, causantes de la Bonamiosis que ha provocado grandes pérdidas en cultivos de ostra de todo el mundo. Concretamente, la especie *B. exitiosa* ha sido detectada recientemente en ostra plana (*Ostrea edulis*) cultivada en Galicia y Francia (Abollo y col., 2008; Figueras y Novoa, 2011). En segundo lugar, *Haplosporidium nelsoni* agente responsable de la Haplosporidiosis que afecta a ostra americana (*Crassostrea virginica*) (Burrenson y Ford, 2004); *Marteilia refringens*, agente patógeno asociado a la Marteiliosis que lleva provocando, junto con *B. ostreae*, continuas epidemias desde los años 60, en cultivos de ostra plana (Balseiro, 2008). Además ha originado pérdidas comerciales de importancia en almeja, berberecho, vieira y navaja, en Galicia, Francia, Italia, Marruecos, costas de Florida, Islas Fiji y en Japón (Berthe y col., 2004). Es de señalar que se ha identificado la presencia de *M. refringens* en cultivos de mejillón en aguas de Galicia pero sin que se registrasen mortalidades asociadas (Figueras y Novoa, 2011). Otros agentes patógenos son *Mikrocytos mackini* causante de la Mickrocitosis (Carnegie y col., 2003) y *Perkinsus marinus* y *Perkinsus olseni* responsables de la Perkinsiosis en ostra americana. A finales de los 80 se registraron en España y Portugal, mortalidades en cultivos de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) ocasionadas por *P.olseni* (Figueras y col., 1992; Villalba y col., 2004; Figueras y Novoa, 2011).

En lo que a las enfermedades bacterianas se refiere; éstas de manera frecuente, están asociadas a patógenos pertenecientes al género *Vibrio*. Destacan la enfermedad del anillo marrón (BRD) que afecta a almejas (*R. philippinarum* y *R. decussatus*) (Paillard y col., 1989; Paillard y Maes, 1990; Borrego y col., 1996a; Paillard, 2004) o incluso, se cree que estas bacterias también podrían estar implicadas, junto con otros agentes patógenos como *Vibrio splendidus*, en la mortalidad de verano en ostra (*C. gigas*); enfermedad de gran complejidad que parece estar influenciada por

la presencia de estresantes ambientales, selección genética o tipo de gestión del cultivo (Lacoste y col., 2001a; Lacoste y col., 2001b; Le Roux y col., 2002; Waechter y col., 2002; Dégremont, 2011; Pernet y col., 2012). Los vibrios son bacterias gram-negativas, con forma curva similar a una coma y que pertenecen a la clase Gammaproteobacteria. Muchos microbiólogos marinos consideran que las bacterias del género *Vibrio* dominan, con diferencia, las aguas oceánicas (Pruzzo y col., 2005a, 2005b). *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y otras nueve especies de *Vibrio*, son causantes de síndromes severos en humanos. Se ha corroborado que *V. parahaemolyticus* es el causante de gastroenteritis asociadas a la ingesta de marisco en humanos y *V. vulnificus* ocasiona septicemias y serias infecciones e incluso, ha provocado muertes también por consumo de marisco, en los Estados Unidos (Colwell, 1996; Turner y col., 2009; Vezzulli y col., 2012). Otras especies halófilas (*V. tapetis*, *V. alginolyticus*, *V. splendidus*, *V. pectenicida*, *V. harvey*, *V. penaeicida* y *V. anguillarum*) se encuentran en gran cantidad de sustratos bióticos y abióticos, asociados de manera notable al plancton quitinoso (artrópodos y anélidos) y a los moluscos bivalvos del género *Mytilus*, los cuales albergan cantidades significativas de varias especies de vibrios constituyendo importantes reservorios infecciosos de estas bacterias para otros organismos acuáticos como corales, crustáceos y peces (Austin, 2005; Levin, 2006; Lhafi y Künne, 2007; Vezzulli y col., 2010). Con frecuencia, factores ambientales como la temperatura, salinidad o contaminantes van asociados a fenómenos de invasión y colonización del hospedador por parte de la microbiota, los cuales provocan, posteriormente, la aparición de episodios de enfermedades y mortalidades, especialmente en larvas, juveniles y reproductores de áreas naturales y acuícolas (Smolarz y col., 2006; Samain y col., 2008; Francisco y col., 2010).

El conocimiento que se posee acerca del efecto de los vibrios en bivalvos es reducido. Algunos autores aseguran que la presencia de especies pertenecientes al género *Vibrio*, como agente etiológico de enfermedades en cultivos bivalvos, será sin duda uno de los principales problemas en los próximos años (Paillard y col., 2004). El calentamiento de los océanos y las invasiones biológicas de especies exóticas facilitará la expansión de las enfermedades marinas asociadas a estas bacterias (Harvell y col., 2002; Vezzulli y col., 2012); de ahí que exista una necesidad crítica por llevar a cabo estudios que ayuden a comprender la naturaleza de la interacción entre el género *Vibrio* y los moluscos, con el fin de evaluar el riesgo que suponen para el futuro de la acuicultura y la salud humana.

EL SISTEMA INMUNE DE LOS MOLUSCOS BIVALVOS

Los moluscos bivalvos que se han visto implicados en episodios de mortalidades masivas son ostras, almejas e incluso vieiras (Lambert y col., 1998c). Varios autores ya confirmaron hace algunos años que los mejillones parecen ser más resistentes a infecciones y enfermedades que otros bivalvos comestibles (Gestal y col., 2008; Watermann y col., 2008). Por consiguiente, sería interesante saber qué mecanismos son los que proporcionan al mejillón la capacidad de poder combatir microorganismos y otros agentes externos, facilitando así su supervivencia y éxito ecológico. Mediante el estudio de las estrategias de defensa empleadas por el mejillón para hacer frente a patógenos potenciales, se puede mejorar el conocimiento general de las respuestas inmunes innatas de los moluscos bivalvos.

A lo largo de la evolución, los bivalvos han desarrollado un elenco de estrategias efectivas para protegerse así mismos de los ataques de varios patógenos y el estrés ambiental. A pesar de que se ha generado una gran cantidad de información sobre las patologías que afectan a estos organismos, la investigación sobre el sistema inmune de bivalvos y los mecanismos moleculares implicados, se encuentra todavía en un estadio muy temprano, con solo algunas investigaciones en un número de especies muy pequeño (Gueguen y col., 2003; Tanguy y col., 2004). A diferencia de los vertebrados, los moluscos no poseen sistema inmune adaptativo y sin embargo, este hecho no parece suponer un problema puesto que estos organismos están provistos de una elevada capacidad de adaptación a los diferentes ambientes en los que viven (medios acuáticos marinos, de aguas salobres, de agua dulce y ambientes terrestres), caracterizados por la presencia de microorganismos y contaminantes industriales, exhibiendo respuestas inmunes únicas (Terahara y Takahashi, 2008). Asimismo, son capaces de sobrevivir a infecciones causadas por virus patogénicos potenciales, bacterias y hongos mediante la activación de varios mecanismos de defensa (Iwanaga y Lee, 2005; Little y col., 2005; García-García y col., 2008). Las barreras externas físico-químicas que poseen estos organismos tales como conchas, mucus con enzimas dotados de actividad bactericida y el epitelio, constituyen la primera línea defensiva contra patógenos y parásitos. Una vez superada ésta, es el sistema de defensa interno el que entra en juego. Esencialmente, el sistema inmune de los moluscos bivalvos está mediado por componentes de tipo innato, no linfoide, que incluye factores de defensa celular y humoral, muy importantes para la protección del hospedador. Ambos procesos trabajan de manera coordinada poniendo en marcha una amplia gama de

respuestas inmunes (Ratcliffe y col., 1985; Hoffmann y col., 1996; Gliński y Jarosz, 1997).

MECANISMOS DE ATAQUE A LA MEMBRANA

Recientemente se ha sugerido que el ataque físico a las membranas de los microorganismos invasores podría ser un mecanismo esencial de defensa inmune innata en moluscos bivalvos. He y colaboradores (2011) describieron la presencia de un gen expresado en macrófagos (MPEG) en ostra del Pacífico (*C. gigas*). Dicho gen contiene estructuralmente un dominio MACPF o dominio de ataque a la membrana y perforina, implicado en el ataque físico a la membrana de microorganismos (Reiter y col., 1995) y característico de las proteínas pertenecientes a la superfamilia MACPF cuyos miembros más representativos son los integrantes del sistema complemento (MAC) y la perforina. Existen suficientes indicios que confirman el papel crucial de muchas proteínas MACPF en la defensa inmune y mantenimiento de la homeostasis del organismo (Liu y col., 1995; Voskoboinik y col., 2006). Por ejemplo, se ha visto que, tanto la falta como el exceso de actividad de la perforina, posee muchas implicaciones (Voskoboinik y col., 2004, 2005; Rosado y col., 2008) en enfermedades humanas. Deficiencias en la perforina en humanos, pueden provocar desórdenes inmunes fatídicos como la linfocitosis hemofagocítica (LHF) o cáncer hematológico (Stepp y col., 1999; Voskoboinik y col., 2006; Voskoboinik y col., 2007; Baran y col., 2009). Se ha descrito que el 30% de los niños que presentaban el desorden autosomal recesivo de la LHF tenían mutaciones en el gen de la perforina (Stepp y col., 1999; Molleran Lee y col., 2004; Voskoboinik y col., 2005; Urrea-Moreno y col., 2009). Por otra parte, varios estudios revelaron que las especies del género *Plasmodium*, responsable de la malaria, poseen en su genoma cinco genes relacionados con las proteínas MACPF, uno de los cuales posee un papel crítico en la invasión de los esporozoítos hacia el hígado, rompiendo a su paso, la barrera existente entre el sistema circulatorio y los hepatocitos (Kaiser y col., 2004; Ishino y col., 2005).

Se han identificado alrededor de 500 miembros de la superfamilia MACPF en una gran variedad de organismos que se extienden desde bacterias hasta humanos (Rosado y col., 2007) y que incluyen varios grupos de organismos invertebrados marinos como cnidarios, equinodermos o moluscos. No todos los genes descritos que contienen el dominio MACPF estarían únicamente implicados en funciones de defensa física sino que, en algunos casos, como el del gen HeET-1, descrito en el erizo de mar

Heliocidaris erythrogramma, la función estaría también relacionada con el desarrollo embrionario.

LOS HEMOCITOS Y SU PAPEL CENTRAL EN EL SISTEMA INMUNE INNATO

Los efectores principales del sistema inmune de los moluscos bivalvos son los hemocitos los cuales constituyen los componentes celulares de la hemolinfa y juegan un papel central en las respuestas inmunes innatas. Los bivalvos poseen un sistema circulatorio abierto en el que la hemolinfa pasa a través de los extremos de las arterias y riega todos los órganos antes de regresar al corazón a través de los senos y branquias (Song y col., 2010). En invertebrados marinos, constantemente rodeados por microorganismos invasores potenciales y contaminantes, los hemocitos circulantes poseen la capacidad de participar en procesos de detoxificación a través de la acumulación de xenobióticos metálicos y orgánicos, mostrar actividad bactericida además de ser responsables de la fagocitosis de parásitos, patógenos y partículas ajenas. Los hemocitos también pueden participar en la encapsulación de cuerpos extraños demasiado voluminosos y sintetizar diferentes moléculas efectoras (Ratcliffe y col., 1985; Bayne, 1990; Cajaraville y Pal, 1995).

A diferencia de los efectores celulares de vertebrados, los hemocitos presentan una gran diversidad morfológica (Anderson, 1981). Numerosos autores han centrado sus esfuerzos en el desarrollo de una clasificación de los distintos tipos de hemocitos existentes en moluscos bivalvos. Desde los años 70, se han utilizado varios criterios de clasificación, principalmente basados en aspectos de morfología celular y citoquímica enzimática (Bevelander y Nakahara, 1969; Cheng y Rifkin, 1970; Feng y col., 1971; Foley y Cheng, 1974). Pero debido a las limitaciones de los parámetros morfológicos para identificar hemocitos, los experimentos empleados posteriormente se centraron en otras aproximaciones basadas en características de unión a las lectinas (Pipe, 1990a) o en anticuerpos monoclonales que previamente habían sido empleados para caracterizar hemocitos de gasterópodos (Yoshino y Granath, 1983; Dikkeboom y col., 1988) y que se adaptaron a ostra japonesa (Morvan y col., 1991) y mejillón azul (*Mytilus edulis*) (Noël y col., 1994). Actualmente las técnicas más recientes de identificación de tipos hemocíticos se centran en la microscopía y citometría de flujo, herramientas que permiten determinar el tamaño y la granularidad de los hemocitos. Aún así y al igual que ocurre en otros phyla de invertebrados, en moluscos no existe

una clasificación de hemocitos definitiva. Este hecho se debe en parte, a las diferencias de los sistemas inmunes de las diversas especies de invertebrados y también a las de los métodos experimentales usados para estudiarlos. Los autores Cheng (1981) y Hine (1999) han llevado a cabo dos de las revisiones más importantes sobre aspectos morfofuncionales de hemocitos del phylum Mollusca. En sus trabajos identificaron dos tipos fundamentales de hemocitos en la hemolinfa de bivalvos: granulocitos e hialinocitos (o agranulocitos). Existe constancia de que los granulocitos son el tipo celular más abundante en moluscos bivalvos. Contienen gran cantidad de gránulos citoplasmáticos, enzimas hidrolíticas y oxidativas y una mayor actividad fagocítica respecto a los hialinocitos, los cuales muchas veces carecen de dicha capacidad. Los hialinocitos, normalmente, son más pequeños que los granulocitos y poseen pocos o casi ningún gránulo citoplasmático (Tiscar y Mosca, 2004). A su vez, los granulocitos se pueden subdividir, mediante técnicas citoquímicas, en hemocitos granulares eosinofílicos y basofílicos (Moore y Lowe, 1977). Los granulocitos de moluscos poseen una fuerte similitud con los monocitos y macrófagos de vertebrados tanto en la estructura como en la función y comparten con éstos últimas propiedades clave como la fagocitosis, estallido respiratorio inducido por patógenos, producción y liberación de óxido nítrico y enzimas lisosomales (Canesi y col., 2002a). Otros estudios han revelado que algunas subpoblaciones de hemocitos de moluscos poseen una morfología similar a los linfocitos y propiedades fisiológicas similares a las células natural killer (NK) de mamíferos (Monti y col., 1992).

La fagocitosis es un importante mecanismo de control y eliminación de partículas extrañas. Este proceso, mediado por hemocitos, consiste en la internalización física de microbios o restos celulares. Bayne, en su trabajo del año 1990 describe muy bien este proceso de defensa interno y lo subdivide de manera clásica en las siguientes fases: 1) reconocimiento de la partícula no propia 2) migración quimiotáctica 3) adhesión 4) ingestión 5) destrucción y 6) eliminación de la partícula. La fagocitosis es un proceso conservado a lo largo de la evolución, que se da de manera universal en todo el reino animal desde protozoos hasta animales superiores (Feng, 1988). En moluscos bivalvos, se han identificado procesos fagocíticos en diferentes especies como la vieira (*Pecten maximus*) (Mortensen y Glette, 1996), la almeja fina (*R. decussatus*) y almeja dura (*Mercenaria mercenaria*) (Tripp 1992a; López y col., 1997) y también en el mejillón mediterráneo (Carballal y col., 1997; García-García y col., 2008; Parisi y col., 2008). Los hemocitos están presentes no

solamente en las cavidades recubiertas de hemolinfa sino también en muchos tejidos como las branquias, el manto y la glándula digestiva, estando así implicados en una gran variedad de procesos fisiológicos, como pueden ser los mecanismos de digestión, transporte de nutrientes o de excreción y procesos de reparación de la concha (Narain, 1973; Cheng, 1981; Lubet y Mathieu, 1999; Mount y col., 2004; Matozzo y col., 2007). Sin embargo, la función principal de estas células es la defensa contra agentes patógenos (Bayne y col., 1980; Auffret, 1988; Feng, 1988; Cajaraville y Pal, 1995). Los hemocitos son capaces de secretar factores humorales, es decir, factores solubles que juegan un papel fundamental en las respuestas inmunes innatas. Entre ellos se incluyen:

- Enzimas lisosomales: Las enzimas lisosomales producidas por los hemocitos pueden contribuir a la destrucción intracelular y extracelular, y posterior digestión, de los agentes invasores de la célula (Cheng y col., 1975). En bivalvos se han identificado las siguientes enzimas lisosomales, las cuales funcionan como verdaderos lisosomas: lisozima, fosfatasa ácida y alcalina, β -glucuronidasa, lipasa y aminopeptidasa (Cheng y col., 1975; Yoshino y Cheng, 1976; Moore y Lowe, 1977; Moore y col., 2005). Li y col (2008) determinaron un aumento de la expresión del gen de la lisozima en hemocitos de mejillón mediterráneo frente a una infección bacteriana.

- Lectinas: Las lectinas son componentes habituales de la hemolinfa de moluscos, llegando a representar en algunas especies, hasta el 80% de la proteína soluble (Odo y col., 1995). Las lectinas son proteínas ubicuas solubles asociadas a la membrana con dominios específicos de reconocimiento de carbohidratos (DRC) que pueden facilitar las interacciones entre el hospedador y la microbiota u originar respuestas inmunes innatas (Kilpatrick, 2002; McGreal y col., 2004; Vasta, 2009). El papel de estas moléculas en el sistema inmune es fundamental ya que al unirse específicamente a polisacáridos y glicoconjugados presentes en la superficie de microorganismos median los procesos de fagocitosis, melanización y encapsulación (Bayne y col., 1979; Luo y col., 2006), así como la activación del sistema profenol-oxidasa (pro-PO) (Yu y col., 1999; Yu y Kanost, 2000, Yu y col., 2005). Una vez superadas las barreras del proceso de fagocitosis y agregación, los invertebrados ponen en marcha el proceso de encapsulación con el fin de paralizar la entrada de microorganismos (Fisher, 1986; Feng, 1988). Aquellas partículas cuyo tamaño supera en exceso al de un hemocito y, por lo tanto, no pueden ser fagocitadas, se ven rodeadas de hemocitos produciéndose posteriormente un depósito de fibroblastos (Tripp, 1961). Se constituyen una serie de

capas concéntricas donde las más internas están formadas por fibroblastos y residuos mucopolisacáridicos, mientras que las más externas están constituidas por materiales fibrosos formando un retículo en asociación con glicoproteínas (Cheng y Rifkin, 1970). La activación del sistema pro-PO está mediado por la fenoloxidasa (PO), una enzima dependiente de cobre, que cataliza la reacción mediante la que se convierten sustancias fenólicas a quinonas inestables como la dopaquinona (Costa, 2008). Entre las diferentes funciones de este sistema, se encuentra la de activar el proceso de fagocitosis y encapsulación (Söderhall y Smith, 1986). La presencia de la PO ha sido demostrada en mejillón (Little y col., 2005) y en otras especies de moluscos como la ostra y almeja japonesa (*C. gigas*, *R. philippinarum*) (Cong y col., 2005; Hellio y col., 2007). En base a sus características estructurales y funcionales se pueden distinguir entre ocho y quince grupos de lectinas relacionadas con la inmunidad: tipo C, tipo S o galectinas de unión al glucano, específicas tipo I a ácidos siálicos y glucosaminoglucanos, pentraxinas, fucolectinas, ficolinas, taquilectinas, lectinas tipo quitinasa y lectinas sin clasificar *orphan lectins*. Numerosas lectinas de moluscos poseen la capacidad de aglutinar (aglutininas) y en ocasiones opsonizar bacterias u otros parásitos (Chu, 1988; Bayne, 1990). Las proteínas relacionadas con el fibrinógeno (FREPs) también se incluyen dentro del grupo de las lectinas.

Las lectinas funcionan como patrones de reconocimiento de patógenos (PRRs), es decir, moléculas implicadas en el reconocimiento de carbohidratos presentes en la superficie de microorganismos, que en moluscos incluyen los receptores tipo Toll; receptores de mecanismos IMD y proteínas con dominios de oligomerización nucleótido intracelular (NOD) responsables del grado de especificidad que posee el sistema inmune innato frente a patógenos y parásitos (Yeretssian y col., 2008; Gorbushin y Iakovleva, 2011; Romero y col., 2011b; Wei y col., 2012a). El sistema inmune innato puede reconocer varios tipos de estructuras o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). En este proceso de reconocimiento intervienen los PRRs, los cuales se unen a esas estructuras dando lugar a una respuesta inmune. Otro ejemplo de PRRs son las lectinas tipo C, tipo S y ficolinas (Costa, 2008). Además se han identificado total o parcialmente a nivel molecular, diferentes formas de lectinas en varias especies de bivalvos (Bulgakov y col., 2004; Kang y col., 2006; Yamaura y col., 2008; Wei y col., 2012b) y en mejillón (Renwranz y col., 1985; Mullainadhan y Renwranz, 1986).

- Lectinas tipo C: Juegan un papel fundamental en la activación de distintos procesos inmunes como la activación de la pro-PO (Yu y col., 2005), de la actividad bactericida (Suzuki y col., 1990) y fagocítica (Luo y col., 2006), procesos todos ellos implicados en la eliminación del agente patógeno. La modulación de expresión de las lectinas tras la estimulación con agentes bacterianos se ha demostrado en diferentes moluscos bivalvos. Así, en la almeja japonesa la estimulación de los hemocitos con *Vibrio tapetis* dio lugar a la expresión de varios tipos de lectinas (Kang y col., 2006).

- Citoquinas: Las citoquinas son glicoproteínas sintetizadas durante la fase efectora de la respuesta inmune que activan las células de defensa con el fin de eliminar a los patógenos (Liew y Cox, 1991). En mamíferos, actúan como moduladores de los principales procesos inmunes tales como inflamación, proliferación, citotoxicidad y apoptosis y también participan en cascadas de transducción de señales. Algunos autores han sugerido que tanto las citoquinas como los péptidos bioactivos de invertebrados están relacionados con los cambios en la morfología celular, migración, (Hughes y col., 1990; Ottaviani y col., 1995) inducción de óxido nítrico sintasa (NOS) y aumento de la actividad fagocítica a través de mecanismos clásicos de transducción (Ottaviani y col., 1997b). Entre las citoquinas, las interleuquinas, que pertenecen al grupo de las citoquinas quimiotácticas o quimioquinas, están implicadas en procesos de inflamación aguda. Barcia y colaboradores (1999) detectaron en *M. galloprovincialis* la presencia de la subunidad α del receptor de la interleuquina 2 (IL-2R), cuya expresión se incrementó tras la estimulación con LPS (Cao y col., 2004). Por último, otros autores caracterizaron la expresión de IL17 en hemocitos de *C. gigas* estimulados con bacteria (Roberts y col., 2008, 2009).

- Péptidos bioactivos: Los péptidos bioactivos son proteínas que se sintetizan en las células en forma de prepeptidos de gran tamaño, los cuales se rompen y modifican para dar lugar a productos activos. Como moléculas de señalización, los péptidos bioactivos juegan importantes papeles en las funciones fisiológicas y en la patogénesis (Sharma y col., 2011). En hemocitos de bivalvos, se han identificado algunos receptores de péptidos bioactivos como la proopiomelanocortina (POMC), incluyendo la β -endorfina, hormona adrenocorticotrófica (HTCA) y receptores de α -melanotropina así como receptores similares a los de insulina (Stefano y col., 1989; Duvaux-Miret y col., 1992; Sassi y col., 1998; Ottaviani y col., 1998b; Lardans y col., 2001).

- Óxido nítrico (NO): El óxido nítrico (NO) es una molécula señalizadora de importancia y que está involucrada en una gran cantidad de enfermedades patógenas humanas y procesos fisiológicos tanto en vertebrados como invertebrados, incluyendo la regulación vascular, transmisión neural, defensa inmune y apoptosis (Song y col., 2009; Steinert y col., 2010). El NO puede promover o inhibir la apoptosis dependiendo de una gran variedad de factores (Brüne y col., 1999). Aunque el efecto de esta molécula ha sido muy poco estudiado, se sabe que tras la exposición de hemocitos de moluscos a parásitos o patógenos, se da un aumento en la producción de NO (Barcia y Ramos-Martínez, 2008; Terahara y Takahashi, 2008), pero se desconoce si esta inducción posee un efecto sobre el nivel de apoptosis en estas células o si lleva asociado una implicación de la activación de las caspasas (Barcia y Ramos-Martínez, 2008; González-Riopiedre y col., 2009). En vertebrados, el NO se biosintetiza a partir de la L-arginina, oxígeno y NADPH mediante la NO sintasa (NOS) en varios tipos de células como las neuronas, astrocitos, inmunocitos y células endoteliales (Bredt y Snyder, 1990; Moncada y col., 1991). Durante esa reacción se genera un intermediario inestable que es la NG-hidroxiarginina que da lugar a dos productos finales: la citrulina y el NO (Nathan y Xie, 1994). Sin embargo, el NO es un gas inestable que se transforma rápidamente en nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), que constituyen los productos estables de la reacción. En moluscos se ha demostrado la presencia de actividad de sintasas de óxido nítrico y la liberación de NO_2^- y NO_3^- en hemocitos de diferentes especies entre las que se encuentra el mejillón mediterráneo (Arumugam y col., 2000; Gourdon y col., 2000; Torreilles y Romestand, 2001; Tafalla y col., 2002; Tafalla y col., 2003; Novas y col., 2004; Costa, 2008).

- Péptidos antimicrobianos (AMPs): Los péptidos antimicrobianos son pequeñas moléculas proteicas formadas por un número de entre 12 y 50 aminoácidos, altamente conservadas en la evolución, que ayudan en el reconocimiento de patógenos y parásitos marcándolos para su destrucción a través de la opsonización o por muerte directa (Canesi y col., 2002a; Tiscar y Mosca, 2004). Los autores Pallavicini y colaboradores (2008) consideran que el conjunto de los AMPs puede representar cerca del 40% del transcriptoma de hemocitos de mejillón inyectados con preparaciones virales y bacterianas. En consecuencia, los genes que codifican para AMPs constituyen los principales componentes humorales del sistema inmune. Se han encontrado decenas de AMPs en invertebrados marinos (Sperstad y col., 2011). Aunque ya en los años 80 se confirmó la existencia de actividad antibacteriana en moluscos (Kubota y

col., 1985), no fue hasta diez años después cuando tuvo lugar el primer aislamiento y caracterización de verdaderos péptidos antimicrobianos en los mejillones *M. galloprovincialis* y *M. edulis* (Hubert y col., 1996a; Charlet y col., 1996). Los AMPs caracterizados en estas especies, son pequeños péptidos pertenecientes al grupo de AMPs ricos en cisteínas que son producidos como moléculas precursoras y procesadas a péptidos maduros en los gránulos hemocíticos (Mitta y col., 2000c). Hasta hace poco se tenía constancia de la existencia de cuatro grupos diferentes de AMPs con múltiples isoformas clasificados en base a su secuencia primaria y estructura secundaria en *M. galloprovincialis*, más concretamente: defensinas (MGD1 y MGD2), mytilinas (A, B, C, D y E), myticinas (A, B y C) y por último, mytimycinas, el único péptido estrictamente antifúngico con un dominio tipo *EF-hand* (Charlet y col., 1996; Mitta y col., 1999a; Mitta y col., 2000a, 2000b; Padhi y Verghese, 2008; Pallavicini y col., 2008; Roch y col., 2008; Costa y col., 2009a, b; Li y col., 2010; Balseiro y col., 2011; Rosani y col., 2011). Sin embargo, en el año 2012, Gerdol y colaboradores, aumentaron la lista de AMPs en mejillón mediterráneo mediante la descripción de las "gran defensinas" (*Big defensins*) y las mytimacinas.

Los hemocitos también participan de manera directa en la muerte del patógeno y parásito a través de la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS). Este mecanismo consiste en una serie de reacciones bioquímicas que producen grandes cantidades de ROS microbicida denominadas intermediarios de oxígeno reactivos (ROIs) como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo; mediante la unión de la enzima NADH-oxidasa a la membrana (Buggé y col., 2007; García-García y col., 2008; Morga y col., 2009). La citotoxicidad de estas reacciones aumenta especialmente cuando el peróxido de hidrógeno, se convierte posteriormente en ácido hipocloroso por acción de la mieloperoxidasa (MPO) de los hemocitos que posee fuertes propiedades bactericidas y antivirales (Tiscar y Mosca, 2004). Este proceso ha sido identificado en mejillón mediterráneo y azul, ostra americana y japonesa (Pipe, 1992; Torreilles y col., 1996; Ordás y col., 2000; Costa y col., 2009b). Los organismos aeróbicos han elaborado mecanismos de defensa contra los ROIs incluyendo antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. En presencia de moléculas xenobióticas como metales o en presencia de una infección, se pueden experimentar elevados niveles de producción de ROS que, acompañados de una disfunción en la antioxidación, podrían desembocar en estrés oxidativo causando varios tipos de daño

tisular y enfermedades, pérdida de funcionalidad celular y en último lugar, muerte celular por apoptosis o necrosis.

Dentro de las diferentes funciones de las células inmunes de moluscos, la muerte celular programada apoptótica o apoptosis ocupa la primera posición, por su papel de gran importancia en la adecuada eliminación de células infectadas o dañadas (Terahara y Takahashi, 2008).

LA MUERTE CELULAR Y SU SIGNIFICADO FISIOLÓGICO EN VERTEBRADOS

Desde mediados del siglo XX, se dejó constancia de que la muerte celular jugaba un papel destacado en los procesos fisiológicos de los organismos multicelulares, especialmente durante la embriogénesis y la metamorfosis. Michelson (1963) (Sokolova, 2009), se refiere a ella como un mecanismo de defensa inmune presente en gasterópodos que sirve para enfrentarse a una variedad de agentes patológicos entre los que se incluyen los trematodos, protozoos y bacterias. El término *muerte celular programada* (PCD: **P**rogrammed **c**ell **d**eath) fue introducido en el año 1964 por Richard A. Lockshin quien afirmó que, la muerte celular en vertebrados que tiene lugar durante el desarrollo de los organismos no ocurre accidentalmente sino que obedece a una serie de pasos secuenciales y controlados que conllevan a una autodestrucción establecida a nivel local y temporal. La PCD juega un papel importante en la eliminación de células dañadas o perjudiciales y en el funcionamiento normal del organismo, incluyendo el desarrollo embrionario, la morfogénesis de los tejidos, eliminación de estructuras que no son necesarias en organismos maduros durante la metamorfosis de insectos y anfibios (Jacobson y col., 1997; Vaux y Korsmeyer, 1999) y en los procesos patológicos. De todos los tipos de PCD que se han descrito en organismos multicelulares, sin lugar a dudas, la apoptosis dependiente de caspasas juega un papel vital en muchos procesos inmunes incluyendo la homeostasis. Sin embargo, en los últimos años, la idea de que las células podían suicidarse mediante mecanismos distintos a la apoptosis ha ido consolidándose y entre ellos, se ha prestado especial atención a algunas formas de muerte altamente conservadas como la necrosis, la autofagia o la piroptosis (Proskuryakov y col., 2003; Lockshin y Zackeri, 2004; Walsh y Edinger, 2010).

LA NECROSIS

La necrosis se define como una forma de muerte celular pasiva y frecuentemente se la compara con un accidente de tren, a diferencia de la apoptosis que sería equiparable a un suicidio (Edinger y Thompson, 2004). La necrosis es el resultado de una catástrofe bioenergética que provoca la disminución del ATP hasta reducirse a niveles incompatibles con la supervivencia celular. Se origina a partir de perturbaciones ambientales con liberación incontrolada de contenido celular inflamatorio en el que la célula sufre daños, resultando en una pérdida de la integridad de la membrana plasmática, vacuolización del citoplasma, hinchazón y trastorno celular (Leist y Jäättelä, 2001). Las células que mueren por necrosis, normalmente, exhiben cambios en la morfología nuclear pero sin embargo, no experimentan condensación organizada de la cromatina ni fragmentación del ADN en fragmentos de 200 pares de bases, aspectos característicos de la muerte celular apoptótica.

LA AUTOFAGIA

La muerte celular por autofagia lleva asociada la degradación celular por lisozimas internas (Bursch, 2001). Existen importantes conexiones entre la muerte celular apoptótica y la autofágica dado que ocurren de manera simultánea en muchos procesos (Velentzas y col., 2007). En la actualidad, la autofagia o muerte celular tipo II, está siendo intensamente investigada en mamíferos. Se trata de una forma de muerte celular no apoptótica altamente regulada y conservada, que ocurre de manera independiente a las caspasas. El término autofagia procede del griego <<auto>> que significa "a sí mismo" y <<phagy>> "comer". Literalmente significa "comerse a sí mismo" y consiste en el paso por parte de las células, a un programa catabólico en el que tiene lugar la degradación de constituyentes celulares con el objetivo de producir energía como un mecanismo de supervivencia durante periodos de estrés nutricional (Edinger y Thompson, 2004). La célula puede secuestrar orgánulos dañados y proteínas de vida larga que son encapsulados en una vacuola bicapa autofágica denominada autofagosoma (Lynch-Day y col., 2012). Posteriormente, las moléculas son transportadas a los lisosomas donde tendrá lugar la degradación y reciclaje enzimático. Las células que sufren autofagia están caracterizadas por la presencia de vacuolas citoplasmáticas grandes, degradación del contenido citoplasmático, ligera condensación de la cromatina y expresión de marcadores moleculares típicos de la

autofagia. Las células pueden emplear la autofagia para eliminar orgánulos dañados como la mitocondria en un proceso denominado mitofagia (Dagda y col., 2009).

LA PIROPTOSIS

Otra forma de PCD es la piroptosis la cual requiere la activación proteolítica de la caspasa 1 en un proceso inflamatorio desencadenado por varios estímulos patológicos, como puede ser un golpe, ataque al corazón o cáncer; y es crucial para el control de las infecciones microbianas (Bergsbaken y col., 2009). Durante este proceso tiene lugar una rápida pérdida de la integridad de la membrana celular y liberación del contenido citosólico. El papel de la piroptosis *in vivo* no está todavía muy claro. Al principio se propuso que podía tratarse de un mecanismo empleado por las bacterias para destruir las células inmunes del hospedador pero estudios más recientes sugieren que podría consistir en un mecanismo de defensa del hospedador para eliminar los patógenos intracelulares (Miao y col., 2010).

LA ONCOSIS

Recientemente términos como oncosis, han sido aceptados por los investigadores para referirse a la muerte celular como contrapartida a la apoptosis. La oncosis (de *onkos*, que significa encogimiento) se define como un mecanismo pre-lethal que conduce a la muerte celular y va acompañada de encogimiento tanto celular como de los orgánulos, embebimiento, y aumento de la permeabilidad de la membrana. El proceso de oncosis conlleva en último lugar, a la disminución del almacén de energía celular y fallo de las bombas iónicas en la membrana plasmática (Miao y col., 2010).

LA APOPTOSIS

Aunque varios autores han considerado que los dos mecanismos de señalización de PCD más importantes son la autofagia y la apoptosis (Bursch, 2001; Lockshin y Zakeri, 2004), ésta última es la que ha recibido una mayor atención por parte de la comunidad científica en las últimas décadas. Una búsqueda del término "apoptosis" en Pubmed genera en torno a 234.905 entradas mientras que la palabra "autophagy" origina tan solo 11.048. Kerr y colaboradores (1972) acuñaron el término apoptosis cuyo origen procede de la palabra griega <<*apóptōsis*>> (de *apó* que significa "a partir de" y *ptō* que quiere decir "caída"). Este vocablo fue adoptado en analogía a las hojas que caen de los árboles en otoño o a los pétalos que se

desprenden de una flor, para describir una forma particular de PCD. Una definición reciente de apoptosis describe este proceso como aquella forma de PCD que elimina células dañadas o superfluas de manera controlada, minimizando el daño y la disrupción a las células vecinas y que es vital para el desarrollo embrionario, sistema inmune y homeostasis de los tejidos (Repnik y Turk, 2010). Durante el proceso apoptótico no tienen lugar reacciones inflamatorias asociadas a la apoptosis propiamente dicha ni tampoco durante la eliminación de las células apoptóticas debido a que éstas, no liberan los constituyentes celulares al tejido intersticial que la rodea, porque son fagocitadas rápidamente por las células circundantes previniendo así una necrosis secundaria. Además, las células ingeridas no producen citoquinas anti-inflamatorias (Savill y Fadok, 2000; Kurosaka y col., 2003). La apoptosis está definida por una serie de cambios morfológicos que afectan a una única célula o pequeños clústers celulares (Elmore, 2007) que son consecuencia de una serie de cambios moleculares y bioquímicos propios del proceso apoptótico (Tabla 1).

Características	Apoptosis temprana	Apoptosis tardía
Morfológicas	Encogimiento celular Condensación de la cromatina	Deformación de la membrana plasmática Fragmentación nuclear Formación de cuerpos apoptóticos
Bioquímicas	Activación caspasas iniciadoras Entrecruzamiento proteico Expresión marcadores celulares superficie (Fosfatidilserina)	Activación de caspasas ejecutoras y endonucleasas citoplasmáticas Fragmentación ADN Aumento permeabilidad de la membrana mitocondrial

Tabla 1. Características típicas de la apoptosis

En una célula sana el fosfolípido fosfatidilserina (PS) está localizado de manera activa en la cara más interna de la membrana plasmática. Cuando las células sufren apoptosis, se inicia un proceso de pérdida de la distribución de esta molécula, pasando a estar expuesta hacia la cara externa de la membrana celular. La annexina V es una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina en un proceso que requiere la presencia de calcio. Por tanto, la PS se une a aquellas células apoptóticas, es decir, en donde la PS está expuesta. A su vez, la annexina V puede conjugarse con varios fluorocromos, entre los que se incluye la fluoresceína isotiocianato (FITC). Este fluorocromo asociado a la annexina V, formando así la annexina V-FITC, conserva su alta afinidad por la PS y por tanto se emplea de manera frecuente en los análisis de citometría de flujo de células que sufren apoptosis. Sin embargo, la externalización de la PS ocurre en estadios tempranos de la apoptosis, por lo que la tinción de células con annexina V-FITC revela la existencia de células apoptóticas tempranas en lugar de células que se encuentran en procesos de fragmentación de ADN, fase correspondiente a la apoptosis tardía. Otro de los procesos asociados a la apoptosis tardía, previo a la muerte celular, es la fragmentación celular la cual desemboca en la formación de estructuras cerradas membranosas compactas que se denominan cuerpos apoptóticos. Éstos contienen restos de citosol, cromatina condensada y orgánulos celulares (Kerr y col., 1972; Wyllie y col., 1980). Los cuerpos apoptóticos son ingeridos por los macrófagos y se eliminan del tejido sin producir una respuesta inflamatoria.

Entre las modificaciones bioquímicas que tienen lugar durante la apoptosis destaca también la activación de enzimas proteolíticas que conllevan a una rotura del ADN en fragmentos; primero de gran tamaño, entre 50 y 300 kilopares de bases y posteriormente en fragmentos más pequeños denominados oligonucleosomas (Wyllie y col., 1980; Schwartzman y Cidlowski 1993; Enari y col., 1998; Zheng y col., 1998).

La apoptosis es un tema de creciente interés en la biología celular para el estudio del desarrollo de los organismos e investigación de enfermedades. Asimismo, se ha corroborado que trastornos y alteraciones del programa apoptótico conducen a una gran variedad de condiciones patológicas como el cáncer, enfermedades autoinmunes e infecciones virales. Se ha comprobado como algunos desórdenes neurodegenerativos, SIDA y enfermedades isquémicas están causados o impulsados por una apoptosis excesiva (Fadeel y col., 1999b).

MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN APOPTÓTICA

El análisis de la apoptosis en sistemas modelo, tanto vertebrados como invertebrados, ha servido para reconocer que es un proceso celular altamente orquestrado, multifuncional y muy conservado en la evolución puesto que ocurre en todos los tipos de metazoos, puede jugar un papel en la biología de las plantas e incluso se han observado mecanismos de muerte celular similares a apoptosis en levaduras (Solomon y col., 1999; Frohlich, 2000; Tittel y Steller, 2000; Skulachev, 2002).

La descripción de los mecanismos apoptóticos se ha basado, de manera predominante, en estudios llevados a cabo en modelos vertebrados como humano (*Homo sapiens*) o ratón (*Mus musculus*) e invertebrados como el gusano (*Caenorhabditis elegans*) y mosca (*Drosophila melanogaster*). Concretamente, la existencia de un programa de suicidio controlado que corresponde a la morfología apoptótica fue descubierto por primera vez en estudios realizados con *C. elegans*. Horvitz y colaboradores demostraron que la muerte fisiológica de 131 células, de las 1.090 células somáticas que se generan durante el desarrollo de este nematodo, eran controladas por al menos tres genes: CED-3, CED-4 y el CED-9 (Hengartner y Horvitz, 1994a; Liu y Hengartner, 1999). Mutaciones en la pérdida de funcionalidad de CED-3 y CED-4 o ganancia de la funcionalidad de CED-9, bloqueaban la muerte celular (Joza y col., 2002). En el año 2002, Sydney Brenner, Robert Horvitz y John Sulston, recibieron el Premio Nobel de Medicina y Fisiología por sus trabajos sobre la muerte celular programada y el establecimiento del nematodo *C. elegans* como modelo animal para el estudio de éste y otros procesos fundamentales del desarrollo.

La apoptosis es un programa de muerte celular altamente eficiente y muy regulado, que requiere la intervención de una multitud de factores. La apoptosis se puede iniciar por varios estímulos originados dentro o fuera de la célula como por ejemplo la activación de los receptores de la superficie celular, el daño al ADN provocado por la existencia de anomalías en los mecanismos de reparación, la exposición a compuestos citotóxicos, la radiación o la falta de señales de supervivencia, entre otros. Señales de muerte tan diversas parecen desencadenar, posteriormente, una maquinaria común de muerte celular que posee los rasgos característicos de la muerte celular apoptótica. En síntesis, varias señales de muerte activarían mecanismos comunes de señalización. De este modo, se distinguen dos

mecanismos principales: mecanismo extrínseco y mecanismo intrínseco o mitocondrial. A pesar de que ambos mecanismos pueden ocurrir de manera independiente, existe una importante interacción entre ellos que permite la amplificación de la señal de muerte (Feig y Peter, 2007).

MECANISMO EXTRÍNSECO

La señalización apoptótica extrínseca tal y como está definida en vertebrados, está mediada por la activación de los denominados “receptores de muerte”, es decir, receptores de la superficie celular, miembros de la subfamilia TNFR como el CD95/Fas, TRAILR y el factor de necrosis tumoral receptor-1 (TNFR1), mediante los que se transmiten las señales apoptóticas tras la unión a ligandos específicos: FasL, el TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) y el TNF α respectivamente (Repnik y Turk, 2010) (Figura 8). Todos los miembros de la subfamilia TNFR están formados por subdominios extracelulares ricos en cisteína que les permiten reconocer específicamente a sus ligandos, resultando en la trimerización y activación de los respectivos receptores de muerte (Naismith y Sprang, 1998). Posteriormente, la señalización está mediada por la parte citoplasmática del receptor de muerte que contiene una secuencia conservada denominada dominio de muerte (DD). Las moléculas adaptadoras como el FADD o el TRADD poseen ambas DDs a través de las cuales son reclutadas a los dominios DD del receptor de muerte activo formando lo que se denomina el complejo de señalización inducida de muerte o DISC (Death inducing signalling complex). Después ocurre la activación autocatalítica y liberación de la caspasa activa 8 o 10, caspasas con dominios DED, que son procesadas hacia las caspasas efectoras las cuales, posteriormente rompen sustratos específicos dando lugar a la muerte celular. Algunos autores denominan a este mecanismo apoptótico, en el que la apoptosis se induce directamente y de manera dependiente de las caspasas, como tipo I (Scaffidi, 1998). También puede ocurrir que la señal de muerte procedente de los receptores activos no genere una cascada de señalización de caspasas lo suficientemente fuerte como para ejecutar la muerte celular por sí misma. En este caso, algunos autores hablan de mecanismo extrínseco tipo II. Durante este proceso, la señal necesita ser amplificada mediante mecanismos apoptóticos dependientes de la mitocondria.

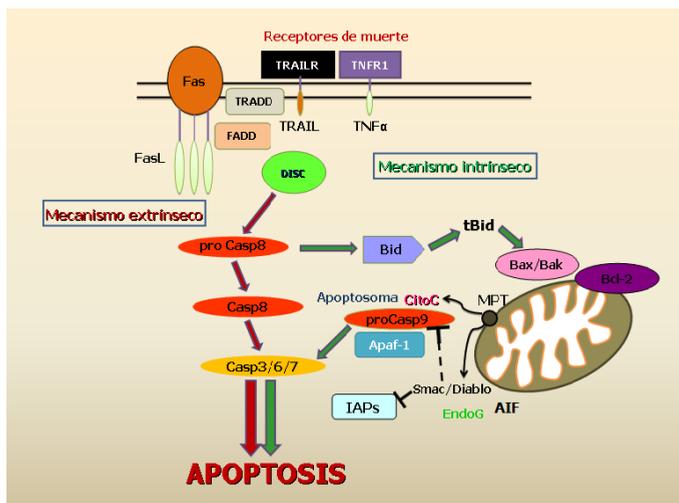


Figura 8. Mecanismos extrínseco e intrínseco de la apoptosis

MECANISMO INTRÍNSECO O MITOCONDRIAL

Los factores que dan lugar a la activación de la apoptosis a través del mecanismo mitocondrial o intrínseco (Figura 8) son estímulos que proceden del interior de la célula e incluyen el daño al ADN, el daño oxidativo de la mitocondria o proteínas citosólicas y lípidos, el estrés del retículo endoplasmático, radiación ultravioleta, estimulación viral y/o retirada de señales pro-mitogénicas (retirada del factor de crecimiento) (Circu y Aw, 2008). También una gran variedad de agentes citotóxicos (drogas quimioterapéuticas) y estresantes ambientales pueden conducir al suicidio celular apoptótico mediado por la mitocondria (Kaufmann y Earnshaw, 2000; Wang, 2001; Franco y col., 2009). La apoptosis intrínseca, tal y como se ha definido en vertebrados, está caracterizada por la apertura del poro de transición de permeabilidad de la membrana mitocondrial (MPT), compuesto por el canal anión dependiente del voltaje (VDAC), el translocador nucleótido de adenina (ANT) y la ciclofilina D (CyF-D). Asimismo, se produce un aumento repentino de la permeabilidad de la membrana mitocondrial más externa (MOMP), el colapso del potencial transmembrana interno de la mitocondria ($\Delta\psi$) (Mignotte y Vayssière, 1998) y la liberación del citocromo C. El citocromo C se considera como el principal marcador del mecanismo apoptótico intrínseco en vertebrados y una vez que se libera al citoplasma (Bernardi, 1999; Loeffler y Kroemer, 2000), interactúa con el factor de activación apoptótico peptidasa 1

(Apaf-1) a través del dominio WD40 de éste. Posteriormente, el Apaf-1 estaría dotado de la capacidad de reclutar a la caspasa iniciadora 9, en un proceso de interacción mediado por el dominio de reclutamiento de las caspasas (CARD) presente tanto en el Apaf-1 como en la caspasa 9 (Li y col., 1997). La asociación del citocromo C, Apaf-1 y caspasa 9 en presencia de ATP/dATP, da lugar a la formación de un complejo multimolecular denominado apoptosoma. Por último, la caspasa 9 es capaz de romper y activar a la caspasa efectora 3 que conduce a la activación de la cascada apoptótica (Liu y col., 1996; Li y col., 1997; Goldstein y col., 2000). Las caspasas son una familia de cisteín proteasas con un papel crucial en la ejecución de muchas de las actividades que dan lugar a la desintegración celular.

El proceso de liberación del citocromo C desde la mitocondria ha sido extensamente descrito en vertebrados, incluyendo mamíferos y anfibios (Kluck y col., 1997a, b). Sin embargo, existe controversia acerca de cual es el papel exacto de MOMP y del citocromo C en la apoptosis de invertebrados. Por otra parte, la familia de proteínas Bcl-2, constituida por proteínas pro-apoptóticas como las *BH3-only* y anti-apoptóticas, como la Bcl₂; es la encargada de regular la liberación de señales apoptóticas desde la mitocondria (Hengartner, 2000; Wang, 2001; Koonin y Aravind, 2002). La proteína Bid, una proteína *BH3-only*, actúa de mediadora entre la cascada de señalización de las caspasas y la mitocondria. La caspasa 8 rompe al Bid que se transforma en tBid o forma truncada, la cual se desplaza a la mitocondria donde participa junto con los miembros de la familia Bcl-2; Bax y Bak, en la inducción de la liberación del citocromo C y otros factores pro-apoptóticos mitocondriales como el SMAC/DIABLO el cual interactúa con las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) (Luo, 1998; Du y col., 2000; Verhagen y col., 2000; Koonin y Aravind, 2002;). Las IAPs también participan en la regulación de la muerte celular suprimiendo la apoptosis (Deveraux y Reed, 1999) y actuando sobre otros mediadores del proceso apoptótico como las caspasas (Kaufmann y Gores, 2000) (Figura 8).

De manera independiente a las caspasas, existen otras moléculas efectoras de muerte que también pueden desencadenar el proceso de suicidio celular. Entre las más destacadas, se encuentran el factor de inducción de apoptosis (AIF); una flavoproteína mitocondrial conservada filogenéticamente y la endonucleasa G, una nucleasa específica de la mitocondria (Susin y col. 1999; Li y col. 2001; Van Loo y col. 2001; Cande y col., 2002; Tait y Green 2008). Estas dos proteínas se trasladan desde la mitocondria al núcleo, donde se unen al ADN, dando lugar a su fragmentación y por

último a la muerte celular. Además de la mitocondria, otro orgánulo en el que se localizan muchos de los pasos de control críticos para el mecanismo apoptótico es el retículo endoplasmático (ER). Se trata de un orgánulo subcelular implicado en la síntesis de proteínas de membrana y/o secretoras, y lípidos (Hussain y col., 2007). Dado que el ER requiere varios factores para que la capacidad de plegamiento proteico sea óptima, incluyendo el ATP, Ca^{2+} y la oxidación del ambiente, este orgánulo es altamente sensible al estrés el cual perturba los niveles de energía celular, el estado redox o la concentración de Ca^{2+} . Dicho estrés desencadena la acumulación y agregación de las proteínas no plegadas las cuales son tóxicas para las células. Así, numerosas condiciones fisiopatológicas están asociadas con el estrés del ER, incluyendo la isquemia, enfermedades neurodegenerativas y diabetes. Con el fin de mantener la homeostasis en contra de cualquier disfunción asociada al ER, éste responde a través de un complejo mecanismo de señalización coordinado denominado *unfolded protein response* o UPR (Kaufman, 1999; Zhao y Ackerman, 2006;). El UPR transfiere el estrés del ER al citosol y al núcleo, para contrarrestar el desequilibrio en la síntesis proteica, plegamiento, modificación, translocación y degradación. Se ha visto que la falta de glucosa, síntesis proteica elevada, infección vírica, alteraciones de los flujos del Ca^{2+} y regulación redox, conllevan a una disfunción en el ER y desencadenan el UPR. Se tiene poco conocimiento de los mecanismos apoptóticos implicados, aún así, se sabe que la apoptosis inducida por estrés del ER está mediada por la mitocondria y/o a través de la activación de kinasas pro-apoptóticas que intervienen normalmente en la apoptosis extrínseca mediada por receptores de muerte (Hussain, 2007). Algunos autores han confirmado que las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel regulador en el cruce apoptótico entre el ER y, la mitocondria y las caspasas 1, 3, 7, 8 y 12 constituyen mediadores clave de estos procesos apoptóticos (Wang y col., 1998; Wood y Newcomb, 1999; Foghsgaard y col., 2001; Oakes y col., 2006; Lee y col., 2007; Conus y col., 2008).

A pesar de que durante muchos años, se ha pensado que las caspasas eran las principales proteasas implicadas en la ejecución del programa apoptótico (Salvesen y Dixit, 1997; Green y Kroemer, 1998; Ivanova y col., 2008), estudios recientes han confirmado que las proteasas del sistema endosomal/lisosomal, también están implicadas en este proceso, especialmente bajo condiciones patológicas (Turk y col., 2002; Guicciardi y col., 2004). El sistema endosomal/lisosomal es el lugar para la degradación del material celular endocitado y autofagocitado y los lisosomas y

endosomas han sido durante mucho tiempo considerados erróneamente como estructuras estables sólomente implicadas en la muerte celular necrótica, donde las proteasas lisosomales podían llevar a cabo la degradación de los componentes celulares de manera no específica. Sin embargo, existen indicios que revelan que la permeabilización de la membrana lisosomal (LMP) con una posterior liberación de las proteasas lisosomales hacia el citosol, podría iniciar y ejecutar el programa apoptótico en varios modelos (Leist y Jäättelä, 2001; Turk y col., 2002; Guicciardi y col., 2004; Stoka y col., 2007). Las catepsinas son uno de los mayores grupos de enzimas dentro de los lisosomas y estarían formadas por las cisteín-catepsinas, las más abundantes y que incluyen un grupo de 11 enzimas relacionadas (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W y X); y la catepsina aspártico-proteasa D (Turk y col., 2000, 2001, 2002).

Otra familia de proteasas no lisosomales dependientes de calcio son las calpaínas. Estas proteínas están implicadas en una gran variedad de procesos regulados por el calcio como la transducción de la señal, la proliferación celular o la apoptosis (Goll y col., 2003). Fallos en la expresión de las calpaínas pueden dar lugar a importantes enfermedades neuronales como el Alzheimer, Parkinson o Esclerosis múltiple (Saez y col., 2006).

Entre las proteínas anti-apoptóticas mejor estudiadas, se encuentran los clásicos miembros de unión no ribosomales de las proteínas de choque térmico (Hsps). Estas proteínas están presentes en el citosol de todas las células eucariotas y constituyen chaperones moleculares requeridos para el plegamiento y transporte correcto de muchas proteínas implicadas en mecanismos de transducción de la señal.

Otra molécula implicada en procesos apoptóticos es el NF- κ B, perteneciente a la familia del factor de transcripción Rel/ NF- κ B. En mamíferos actúa como un factor de transcripción bifuncional ya que su activación conduce a la expresión de genes pro y anti-apoptóticos. Mientras que la luz ultravioleta puede inducir apoptosis a través de la liberación de dímeros de NF- κ B los cuales a su vez suprimen la transcripción de genes anti-apoptóticos (Ashikawa y col., 2004; Campbell y col., 2004); el NF- κ B también puede bloquear la apoptosis mediante la sobre-regulación directa de las IAPs (Kucharzszak y col., 2003).

En cuanto a los distintos mecanismos de señalización implicados en las respuestas al estrés ambiental, se ha visto que las protein-quinasas activadas por el mitógeno (MAPKs) juegan un papel significativo (Schaeffer y Weber, 1999; Widmann y

col., 1999; Kyriakis y Avrusch, 2001). La cascada MAPK se puede activar mediante varias moléculas entre las que se encuentra la protein kinasa C (PKC) y las GTPasas de la familia Ras. Entre estas GTPasas se encuentra la subfamilia Rho que está implicada en la regulación del crecimiento celular y la apoptosis (Lacal, 1997).

Una proteína relacionada con el proceso apoptótico que está siendo objeto de estudio en la actualidad con el fin de averiguar su papel funcional en humanos es la apolipoproteína D (apoD). Esta proteína, también denominada Lazarillo, es una glicoproteína secretada durante el desarrollo neuronal y envejecimiento, y que está relacionada con varias enfermedades del sistema nervioso como la esquizofrenia, Alzheimer o esclerosis múltiple. También podría estar implicada en la modulación de la apoptosis regulada por el mecanismo NF- κ B para el que posee varios sitios de unión (Sánchez y col., 2006). Otro mecanismo clave relacionado con la muerte celular apoptótica es el mediado por la familia de receptores de reconocimiento de patrón intracelular o NACHT-LRR (NLR), un grupo especializado de receptores intracelulares que representan un componente clave del sistema inmune innato del hospedador. Un gen relacionado funcionalmente con el mecanismo NLR es la proteína tipo speck asociada a la apoptosis que contiene un dominio CARD (ASC). El ASC funciona como proteína adaptadora y media la interacción entre las proteínas NALPs, miembros de la familia NLR, y la caspasa 1 (Martinon y Tschopp, 2005).

Los receptores transmembrana tipo integrina median las funciones biológicas atribuidas a las interacciones entre la matriz extracelular (MCE) y la célula (Boudreau y Jones, 1999; Martin y Vuori, 2004; Redding y Juliano, 2005; Marastoni y col., 2008). Las interacciones célula-MCE tienen una gran importancia en la mediación de la supervivencia celular, por ello la disrupción o pérdida de la unión de la integrina induce la PCD; concretamente una forma de apoptosis dependiente de caspasas denominada *anoikis* (apoptosis inducida por desprendimiento o muerte celular mediada por las integrinas).

LA APOPTOSIS EN INVERTEBRADOS

Los numerosos trabajos que han visto la luz en los últimos años relativos al estudio de la apoptosis, resaltan que la complejidad del proceso apoptótico en vertebrados es sustancialmente mayor respecto a organismos menos evolucionados como los invertebrados modelo *Drosophila* o *C. elegans* (Figura 9), conduciendo a la

especulación de que ha existido una expansión específica en vertebrados y diversificación evolutiva de genes relacionados con la apoptosis (Aravind y col., 2001).

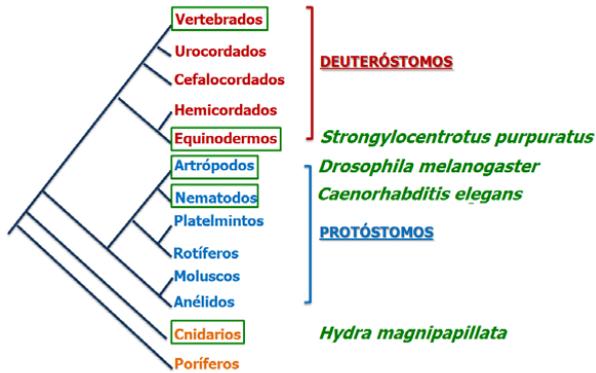


Figura 9. Árbol filogenético de organismos modelo

Los datos existentes hoy en día sobre apoptosis en invertebrados, se basan en los amplios estudios llevados a cabo con el nematodo *C. elegans* y el insecto *Drosophila*; dos organismos pertenecientes al grupo de los ecdisozoos. En comparación con *Drosophila* o humano, la red apoptótica de los nematodos es mucho más sencilla (Colin y col., 2009) (Figura 10).

A diferencia de otros animales, la muerte celular programada (PCD) no es esencial para la viabilidad de *C. elegans*, al menos en estudios llevados a cabo en laboratorio (Ellis y Horvitz, 1986). No existen indicios de la implicación de dominios de muerte en el programa apoptótico de este organismo y tampoco se han encontrado proteínas inhibitoras de apoptosis (IAPs) que participen activamente en este proceso, a diferencia de los vertebrados (Geng y col., 2008; Lasi y col., 2010b). Los estudios genéticos llevados a cabo en *C. elegans* demostraron que un gen homólogo al Apaf-1 de humanos, el CED-4, estaba localizado por encima del CED-3, el homólogo de la caspasa 3 (Yuan y Horvitz, 1992), dentro de la cascada apoptótica. Asimismo, el CED-9, una proteína homóloga al Bcl₂ de vertebrados, regula negativamente al CED-4, mediante su secuestro a la mitocondria, previniendo la activación del CED-3 y por tanto, el desencadenamiento de la apoptosis (Shaham y Horvitz, 1996) (Figura 10). La maquinaria de muerte en este organismo, se activa cuando el EGL-1, un homólogo pro-apoptótico *BH3-only* de la familia Bcl-2 se une al CED-9 en la mitocondria y

desplaza al CED-4 (Conradt y Horvitz, 1998). El CED-4 liberado se oligomeriza y entonces se une al CED-3, dando lugar a la apoptosis (Conradt y Horvitz, 1998). A diferencia del Apaf-1, el CED-4 carece de la región WD40 y por tanto no se uniría al citocromo C (Hu y col., 1998a, 1998b). De manera distinta a lo que ocurre en nematodos, el Apaf-1 no está localizado en la mitocondria por lo que no puede unirse al gen anti-apoptótico Bcl₂ (Newmeyer y col., 2000), y en su lugar éste inhibe la apoptosis bloqueando el MOMP, una función no observada en CED-9 y por tanto en nematodos (Delivani y col., 2006).

En el caso de *Drosophila* (Figura 10), organismo que está formado por un número de células mil veces superior al de *C. elegans*, la presencia de un programa de muerte celular es necesario para la consecución satisfactoria del desarrollo y, una inhibición de la apoptosis resultaría en defectos severos y letalidad del organismo (White y col., 1994, Grether y col., 1995; Xu y col., 2005; Srivastava y col., 2007). Al igual que en vertebrados, la apoptosis en mosca está regulada por una gran variedad de estímulos que se pueden originar bien a partir de la propia célula o proceder del ambiente (Kornbluth y White, 2005).

Estudios genéticos llevados a cabo confirman que la apoptosis en *Drosophila* estaría regulada a través de las IAPs. Concretamente, los estímulos de muerte se transmiten mediante la expresión de los inhibidores de las IAPs, las proteínas pertenecientes a la familia RHG: Reaper, Hid y Grim (Li, 2009) y homólogas a las moléculas Smac/Diablo y HtrA2/Omi de vertebrados. Las RHG poseen un papel mucho más crítico en *Drosophila* que el de sus moléculas homólogas en organismos superiores (Dorstyn y col., 2004) ya que controlan la activación de las caspasas mediante múltiples mecanismos. Además, actúan de mediadoras en la formación de un complejo similar al apoptosoma constituido por la ARK; un homólogo de Apaf-1, y DRONC; el ortólogo de caspasa 9 el cual activaría a su vez las caspasas efectoras DRICE y DCP-1 (Quinn y col., 2000). Por el momento, se desconoce de qué manera tiene lugar el mecanismo de activación de ARK. Aunque esta proteína posee una región WD (Rodríguez y Lazebnik, 1999), no parece que participe en el proceso de mediación de la activación de las caspasas por parte del citocromo C (Fuchs y Séller, 2011).

A diferencia de vertebrados, las células de *Drosophila* no sufrirían MOMP, y el citocromo C no sería una molécula indispensable para que tuviese lugar la activación de las caspasas (Varkey y col., 1999; Dorstyn y col., 2002, 2004; Dorstyn y Kumar,

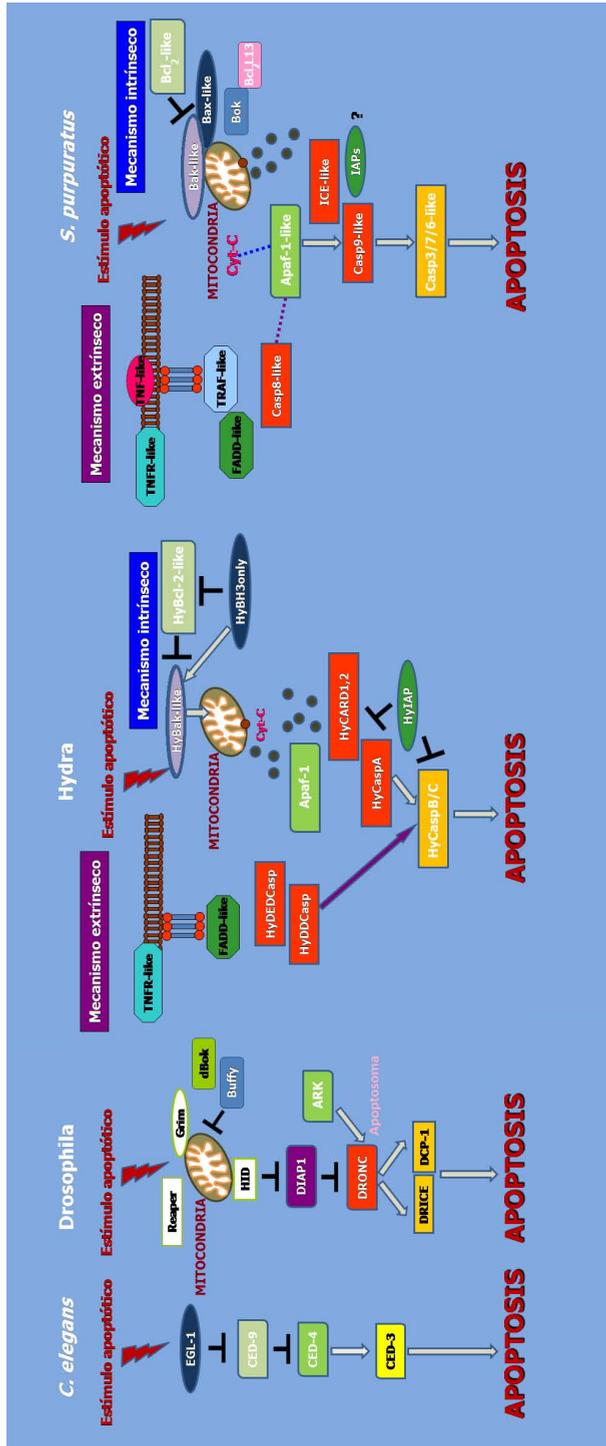


Figura 10. Representación del proceso apoptótico en cuatro organismos invertebrado modelo

2006; Means y col., 2006; White, 2009). Por último cabe destacar que a diferencia de *C. elegans*, la mosca de la fruta carece de proteínas *BH3-only* y las únicas proteínas multidominio pertenecientes a la familia Bcl-2 serían Drob-1/Debcl/dBorg-1/dBok (dBok) y Buffy/dBorg-2 (Buffy), homólogas a la proteína pro-apoptótica Bok/Mtd de vertebrados (Igaki y Miura, 2004) (Figura 10).

Además de las diferencias observadas entre nematodos y artrópodos, se han encontrado procesos apoptóticos diferentes dentro del grupo de los insectos. Kumarswamy y colaboradores (2009) emplearon recientemente células Sf9 para demostrar que la liberación del citocromo C citosólico es un evento esencial para la activación de las caspasas durante la apoptosis de los insectos lepidópteros y dicha liberación podría ocurrir de manera independiente a la pérdida del potencial de membrana y a MPT. Por otra parte, se ha detectado presencia de citocromo C en el citoplasma de células apoptóticas inducidas por luz ultravioleta del gusano de seda (*Bombyx mori*) (Pan y col., 2009). Estos aspectos son distintos a lo observado en *Drosophila* y similares a los de mamíferos (Zhang y col., 2010).

Otro organismo que ha aparecido recientemente como modelo de estudio de la muerte celular programada en el contexto de la homeostasis, desarrollo e inmunidad, es el cnidario *Hydra magnipapillata* (Cikala y col., 1999; Böttger y Alexandrova, 2007; Galliot y Chera, 2010; Lasi y col., 2010a) (Figura 10). En el año 1989 los autores Honegger y colaboradores publicaron un trabajo en el que se constataba el descubrimiento de la formación de cuerpos apoptóticos en *Hydra* (Honegger y col., 1989). En este organismo tiene lugar un proceso apoptótico clásico, bien mediado por receptores o a través del mecanismo intrínseco. Los estudios llevados a cabo en los últimos doce años han demostrado la conservación evolutiva de ambos mecanismos en cnidarios y que parece haberse perdido en ecdisozoos (Cikala y col., 1999; David y col., 2005; Lasi y col., 2010a; Lasi y col., 2010b). El mecanismo extrínseco está mediado por la estimulación extracelular de la familia del receptor de muerte que induce la formación del complejo DISC. Algunos estudios han revelado la expresión de un homólogo del TNFR constituido por dominios de muerte, una caspasa con dominio DED y un ortólogo de la proteína adaptadora FADD (Lasi y col., 2010a). Además, se ha descrito la presencia de caspasas ejecutoras. En cuanto al mecanismo intrínseco, se ha comprobado la existencia de varios genes pertenecientes a la familia Bcl-2; tanto genes multidominio como genes *BH3-only*, a diferencia de lo observado en organismos pre-bilaterales, donde no se han encontrado genes pro-apoptóticos dotados de un

único dominio BH3. Además, la presencia de un homólogo de Apaf-1 (Lasi, 2009) cuya estructura, formada por varias repeticiones WD40 entre otros dominios específicos, hace pensar en una posible interacción con el citocromo C y con las caspasas pero al igual que en *C. elegans* y *Drosophila*, no existen indicios de que se produzca liberación del citocromo C durante la apoptosis (Figura 10).

En gusanos y moscas se ha corroborado la ausencia de homólogos del dominio de muerte de la familia TNFR. Aunque se creía que los receptores de la familia TNF estaban presentes solamente en vertebrados (Bridgham y col., 2003), se han descrito en otros organismos inferiores como erizos de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*), anémonas (*Nematostella vectensis*) y ascidias (*Ciona intestinalis*), lo que indicaría que la aparición de estas proteínas tuvo lugar de manera temprana a lo largo de la evolución, concretamente antes de que se llevase a cabo la divergencia entre cnidarios y organismos bilaterales, y se habrían perdido en otros grupos taxonómicos como el de los nematodos y artrópodos. Sin embargo, los receptores de muerte clásicos aparecieron en vertebrados dado que ni en cnidarios, equinodermos o urocordados como la ascidia *C. intestinalis*, se encontraron homólogos de los receptores de muerte de la familia TNF o ligandos. En cuanto a los ortólogos de TNFRs carentes de dominios de muerte pero implicados tanto en inducción como inhibición de apoptosis, éstos también estuvieron presentes en erizo (Bhardwaj y Aggarwal, 2003; Hehlhans and Pfeiffer, 2005) al igual que sus ligandos. Homólogos de varios adaptadores como el FADD o TRAF estuvieron presentes en este equinodermo. Robertson y colaboradores (2006) revelaron que la complejidad genómica del proceso apoptótico en *S. purpuratus* (Figura 10) es comparable con la de vertebrados pero cualitativamente diferente, y considerablemente mayor que la complejidad observada en cnidarios no bilaterales como la anémona y a su vez mayor que la de artrópodos o nematodos (Figura 10). Mientras que en humano, mosca y gusano solamente hay un Apaf-1, estando ausente en anémona de mar; el erizo contiene al menos dos homólogos de esta proteína con una estructura de dominios distinta y que le permitiría interactuar con proteínas que contienen un dominio de muerte como la caspasa tipo 8 (Hibino y col., 2006). La maquinaria apoptótica en erizo estaría constituida por elementos propios del mecanismo extrínseco e intrínseco. Se han identificado varias caspasas, genes pertenecientes a la familia Bcl-2 como los genes pro-apoptóticos BH3-only Bax y Bak, los genes anti-apoptóticos Bcl-xL y Bcl-2L2 o un gen Bcl₂L13. Además, se han

encontrado varias secuencias de IAPs cuya complejidad estructural se encuentra a medio camino de la de humano y *Drosophila*.

LA APOPTOSIS EN MOLUSCOS

El estudio de la apoptosis en moluscos bivalvos no ha recibido tanta atención como en otros grupos taxonómicos, sin embargo son varios los genes relacionados con la apoptosis identificados en las últimas décadas en estos organismos.

En lo que al mecanismo extrínseco se refiere, en el año 2006, Betti y colaboradores comprobaron que un tratamiento de hemocitos de *M. galloprovincialis* con TNF- α , era capaz de inducir fosforilación rápida y transitoria del p38 y de las JNKs desencadenando la apoptosis. Recientemente, se clonó un homólogo del TNF- α de humano en la oreja de mar (*Haliotis discus*) (De Zoysa y col., 2009a). Además, un miembro del TNFR fue identificado en *Chlamys farreri* (Li y col., 2009) y varios transcritos de un gen tipoTNFR se identificaron en *M. edulis* (Philipp y col., 2012). El factor TNF- α inducido por LPS (LITAF) es un factor de transcripción que controla la expresión génica del TNF- α . Este gen ha sido identificado en varios vertebrados e invertebrados, incluyendo organismos bivalvos como *C. farreri*, *Pinctada fucata*, *C. gigas* y hace pocos años se clonó en la vieira japonesa *Mizuhopecten yessoensis* y en la almeja dura *Meretrix meretrix* (Yu y col., 2007; Park y col., 2008; Zhang y col., 2009; He y col., 2012; Li y col., 2012). Los autores Philipp y col (2012) encontraron 24 fragmentos de un dominio LITAF en el transcriptoma de *M. edulis*.

Yang y colaboradores publicaron un trabajo en el año 2011 en el que caracterizaban tanto el factor como la proteína asociados al receptor de TNF: TRAF y TTRAP, respectivamente, en *C. farreri*. En esta misma especie, Qui y col (2009) describieron un TRAF6. Asimismo, se han identificado un ligando inductor de la apoptosis relacionada con TNF (TRAIL), y un ligando Fas (FasL) en las ostras *C. gigas* y *O. edulis* (Zhang y col., 2011; Morga y col., 2012) mientras que los autores De Zoysa y col. (2009b) clonaron un homólogo de FasL en oreja de mar. Yang y Wu (2010) caracterizaron un ortólogo del TRAIL de humano que denominaron CasTrail, en la ostra *Crassostrea ariakensis*.

En cuanto a la presencia de proteínas adaptadoras, recientemente, Zhang y colaboradores (2011) identificaron en *C. gigas*, una proteína tipo FADD que denominaron CgFADD y cuya estructura proteica era similar al homólogo de humano.

Una única caspasa tipo 8 ha sido caracterizada en la oreja de mar (*Haliotis diversicolor*).

En relación a la presencia de factores mitocondriales liberados durante el MOMP, marcadores del mecanismo apoptótico intrínseco, en *C. gigas* se clonaron un ORF de SMAC/Diablo y una secuencia parcial de un gen tipo AIF (Sokolova, 2009; Châtel y col., 2011; Zhang y col., 2011). Philipp y colaboradores (2012) encontraron varios miembros de la familia AIF; un AIF y un AIFL; en *M. edulis*. Además, varias ESTs de una proteína interactuadora de Apaf-1 (APIP) fueron identificadas en dos especies de almeja (*R. decussatus* y *R. philippinarum*) (Moreira y col., 2012a). Se han identificado tres secuencias pertenecientes a la familia de proteínas Bcl-2 en ostra (*C. gigas*) y mejillón (*M. galloprovincialis*) un Bcl-xL, Bcl-xS y un Bag (Châtel y col., 2011; Zhang y col., 2011).

En el año 2010 los autores Moroz y Kohn identificaron un IAP en el gasterópodo *Aplysia californica*. Recientemente, se encontraron varias ESTs que codificaban para IAPs en almeja (*R. philippinarum*) y ostra (*C. gigas*) (Zhang y col., 2011; Zhang y col., 2012; Moreira y col., 2012b) y Morga y colaboradores (2012) caracterizaron estructuralmente una secuencia de un IAP en *O. edulis* denominada OeIAP.

En cuanto a los mecanismos independientes de caspasas, varias ESTs de catepsinas fueron identificadas recientemente en almeja (*R. philippinarum*) (Moreira y col., 2012b) y *O. edulis* (Morga y col., 2012).

Las Hsps han sido muy estudiadas en moluscos bivalvos como *R. philippinarum* donde las proteínas de esta familia que han recibido mayor atención son la Hsp27, Hsp40/DnaJ, Hsp70 y Hsp90, pero otras, menos comunes, también han sido objeto de análisis (Hsp10, Hsp22, Hsp83 y algunos miembros de la familia Hsp90). Dentro de la familia de las Hsp70 cabe destacar a las mortalinas. Se trata de moléculas que se unen al p53 evitando su translocación al núcleo, inhibiendo así la expresión de genes dependientes del p53 pro-apoptóticos y disminuyendo los niveles de apoptosis en células de moluscos de manera similar a otras especies de vertebrados (Böttger y col., 2008).

En moluscos, todos los componentes claves de la cascada de señalización del NF- κ B han sido descritos y se ha comprobado que poseen una similitud considerable con el mecanismo de señalización homólogo en mamíferos (Ouwe-Missi-Oukem-Boyer

y col., 1994; Montagnani y col., 2004; Zhu y Wu, 2008). Se sabe que el factor de transcripción NF- κ B posee efectos anti-apoptóticos en vertebrados (Aggarwal y col., 2004; Dey y col., 2008). Sin embargo, todavía se desconoce el papel exacto del NF- κ B en la apoptosis de moluscos.

Otro mecanismo de señalización implicado en procesos celulares apoptóticos en bivalvos son las MAPKs (Katsu y col., 1999; Canesi y col., 2002b; Lacoste y col., 2002). Varios autores comprobaron como el LPS y otros factores bacterianos llevaban asociada la activación de las estrés kinasas como el p38-MAPK, JNK o ERK en mejillón (*M. galloprovincialis*) (Canesi y col., 2002b; Betti y col., 2006; Ciacci y col., 2010). Se ha visto que las MAPK actúan de mediadoras durante la fagocitosis y síntesis de las Hsps en hemocitos de *Mytilus* incubados con toxinas y bacterias (Canesi y col., 2002b; Gaitanaki y col., 2004; Kefaloyianni y col., 2005). La protein-kinasa A (PKA) parece estar involucrada en la apoptosis de hemocitos de estos organismos, siendo inducida por la noradrenalina y actuando como un atenuador de los niveles de apoptosis (Lacoste y col., 2002). Los mismos autores comprobaron que en hemocitos de *C. gigas* las señales generadas por las catecolaminas están internalizadas a través de la PKA y PKC. Moreira y colaboradores (2012b) detectaron la presencia de una EST de PKC pero no de PKA, en *R. philippinarum*. Por otra parte, en la especie *A. californica* se han descubierto varios genes rho (Madaule y Axel, 1985).

Otras moléculas no investigadas en bivalvos son la apoD, cuya secuencia fue detectada por Moreira y col. (2012b) en *R. philippinarum*, y la ASC, que parecía estar ausente en *M. edulis* (Philipp y col., 2012) pero que sin embargo Venier y col. (2011) detectaron en *M. galloprovincialis*. Por último, la apoptosis en las células de moluscos también se puede desencadenar mediante la activación de los receptores de superficie, es decir, receptores de hormonas e integrinas. Varios autores han observado como la activación de las integrinas ocurre mediante ligandos específicos o por péptidos que contienen Arg-Gly-Asp (RGD) de unión a la integrina promoviendo la apoptosis de manera similar a los neutrófilos de mamíferos (Terahara y Takahashi, 2008).

OBJETIVOS

Dada la limitación de los recursos pesqueros naturales, la acuicultura se presenta como el sector con el crecimiento más rápido para la producción de alimento animal en el mundo. Con el fin de lograr una actividad acuícola sostenible y duradera que garantice el bienestar animal y la seguridad alimentaria, los productores han de asumir y manejar técnicas de prevención que ayuden a reducir el impacto negativo de agentes externos en la acuicultura de moluscos bivalvos, combatiendo así las consecuentes pérdidas económicas. El desarrollo de estas herramientas requiere de la ayuda científica, por ello, es necesario mejorar el conocimiento de las respuestas fisiológicas y de la defensa inmune de los moluscos frente a agentes patógenos o parásitos, contaminantes y otros estresantes ambientales.

El mejillón mediterráneo es un candidato potencial susceptible de ser tomado como modelo en estudios inmunológicos, dada su alta resistencia a agentes externos (enfermedades o estresantes ambientales) en comparación con otras especies de moluscos bivalvos, además de la importancia comercial y ecológica que posee a nivel global. Además, el estudio de la respuesta inmune en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, aportaría nueva información, sobre la inmunobiología en moluscos y la evolución comparada del sistema inmune en éstas y otras especies de invertebrados.

Este trabajo se centra en la caracterización de moléculas implicadas en la muerte celular, tanto de microorganismos potencialmente patógenos, como es el caso de las moléculas formadoras de poros, como de la muerte de las células propias, fundamentalmente los mecanismos de suicidio celular o apoptosis.

En el desarrollo de los bivalvos, los estadios larvarios son los más sensibles a patógenos, por ello el conocimiento de la inmuno-competencia larvaria a lo largo del desarrollo, puede ser empleado en el apoyo y mejora de la producción acuícola. **El primero de los objetivos** del presente trabajo aborda la descripción de las moléculas formadoras de poros, capaces de destruir microbios invasores a través de la creación de huecos en sus paredes celulares y su papel en el desarrollo y respuesta inmune en larvas de mejillón.

La apoptosis es un proceso fisiológico esencial para el funcionamiento normal del sistema inmune. En este sentido, el programa de suicidio celular en moluscos puede jugar un importante papel en la protección del sistema inmune innato contra agentes externos, por lo que es necesario averiguar de qué manera tienen lugar los

procesos apoptóticos en moluscos bivalvos. El desarrollo de estudios funcionales sobre genes presentes en bivalvos e implicados en multitud de enfermedades humanas como el cáncer, enfermedades del sistema nervioso u otras disfunciones fisiológicas, supone una herramienta muy valiosa para comprender en mayor medida los procesos bajo los que se desarrollan estas enfermedades en los animales y también servirían como nuevos biomarcadores de contaminación. La mejora del conocimiento de los mecanismos moleculares que median la apoptosis en respuesta a agentes externos, ofrecería soluciones innovadoras al tratamiento de las enfermedades y contaminación ambiental, lo que se traduce en una mejora de los niveles de producción acuícola y calidad del producto cultivado. La importancia ecológica del mejillón y la secuencia de cambios ambientales que venimos padeciendo causada por fenómenos como el cambio climático o incidentes contaminantes como la catástrofe del Prestige, justifica la necesidad de identificar genes apoptóticos susceptibles al estrés ambiental, desvelando así las relaciones existentes entre los mecanismos moleculares que median la apoptosis y la respuesta al estrés por parte de estos organismos. En los últimos años, el estudio de este proceso en mamíferos ha recibido mucha atención por parte de la comunidad científica. Sin embargo, debido a la falta de información genética y herramientas moleculares, existe un desconocimiento de este proceso en moluscos y otros organismos invertebrados no modelo. **El segundo objetivo** se centra en la descripción del proceso apoptótico en hemocitos de mejillón utilizando la luz ultravioleta como agente inductor.

Mediante el uso de la biología molecular se podrían identificar aquellos mecanismos moleculares que median la apoptosis en respuesta a agentes externos como patógenos, agentes genotóxicos o contaminantes así como determinar el grado de especificidad de la respuesta. **El tercer objetivo** de este trabajo consiste en caracterizar a nivel estructural seis genes caspasas y analizar su regulación frente a patógenos, estímulos ambientales y contaminantes orgánicos.

La caracterización de genes apoptóticos susceptibles al estrés ambiental, constituye el primer paso para el futuro desarrollo de nuevos biomarcadores de contaminación en el ambiente. **El cuarto objetivo** de la presente memoria de tesis se centra en la caracterización e identificación de genes implicados en la ruta apoptótica intrínseca o mitocondrial del mejillón, con el fin de enriquecer y complementar la escasa información disponible hasta el momento sobre este proceso en moluscos bivalvos.

Como quinto objetivo, se estudia la modulación de la ruta apoptótica mitocondrial mediante el uso de compuestos inhibidores con el objetivo de analizar los mecanismos moleculares inducidos por el estrés ambiental y que conducen a la muerte celular apoptótica en organismos invertebrados marinos.

Para mejorar el conocimiento de las respuestas fisiológicas de los moluscos, **el sexto objetivo** aborda la configuración del mapa apoptótico de estos organismos. En base al entramado apoptótico de vertebrados, se identificarán aquellos genes presentes, ausentes y todavía no identificados en la red apoptótica de los moluscos.

CAPÍTULO I

**ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LAS
MOLÉCULAS FORMADORAS DE POROS EN LA
RESPUESTA INMUNE Y DESARROLLO DEL
MEJILLÓN**

I.1 INTRODUCCIÓN

Las moléculas formadoras de poros poseen un papel relevante en la defensa inmune puesto que son capaces de destruir microbios invasores a través de la creación de huecos en las paredes celulares de estos microorganismos (Parker y Feil, 2005; Bischofberger y col., 2009; Podack, 2009). La destrucción física mediante la creación de agujeros en las membranas es uno de los mecanismos de defensa inmune más poderosos reconocidos como parte del último arsenal biológico del que están dotadas las células para atacar y defenderse. Las moléculas formadoras de poros pueden insertarse a través de la membrana y polimerizar en la bicapa lipídica para crear poros gigantes transmembrana con una función similar a la de un cráter. Los mecanismos moleculares exactos mediante los cuales ocurre la polimerización de estas proteínas no han sido todavía descubiertos (Podack, 2009).

La superfamilia del complejo de ataque a la membrana y perforina (superfamilia MACPF) es una de las mayores familias de moléculas formadoras de poros y que además, están presentes en un amplio rango de organismos vivos tales como bacterias, protozoos, hongos, plantas y animales (Rosado y col., 2008; Kondos y col., 2010). Esta superfamilia está consituida por proteínas que comparten un único dominio central denominado MACPF. Originalmente se denominó así debido a su conservación en los componentes del complejo de ataque a la membrana de mamíferos (MAC) como es el caso de los integrantes del sistema del complemento C6, C7, C8 α , C8 β y C9 y en la proteína formadora de poros perforina (Tschopp y col., 1986). La superfamilia MACPF es inusual debido a la distribución y diversidad funcional de sus integrantes (Kondos y col., 2010). Las proteínas inmunes como la perforina o proteínas del complemento son los ejemplos más característicos de los miembros MACPF (Kondos y col., 2010).

La perforina descrita por primera vez en el año 1985 (Masson y Tschopp, 1985; Podack y col., 1985) es una molécula efectora crucial de los linfocitos citotóxicos de mamíferos (CTL) (Baran y col., 2009) que actúa como mediadora clave del mecanismo de exocitosis granular. Esta proteína se almacena en gránulos ácidos que constituyen lisosomas especializados de secreción (Kondos y col., 2010) y cuyo contenido se libera de manera controlada, a la sinapsis inmunológica de contacto, para eliminar células transformadas o células que han sido infectadas por virus (Natarajan y Cowan, 1998; Voskoboinik y col., 2006; Podack, 2009). Los monómeros de perforina se autoinsertan

atravesando la membrana plasmática de las células diana y a posteriori, participan en un proceso de polimerización que requiere la presencia de calcio, para transformarse después en agregados formadores de poros (Podack y col., 2007; Athanasopoulou y col., 2009). El calcio puede dar lugar a un cambio conformacional mediante la exposición del dominio de unión dependiente de calcio (C2) a las membranas de las células diana (Natarajan y Cowan, 1998; Lukoyanova y Saibil, 2008). El dominio C2 está unido al extremo N-terminal a través de un motivo tipo EGF cuya función no ha sido determinada (Kondos y col., 2010). La parte central alfa-hélice de la molécula de perforina se transforma en dos horquillas anti-paralelas β que conforman un poro con forma de barril (β) (Lukoyanova y Saibil, 2008). Los poros gigantes transmembrana generados en las membranas celulares poseen diámetros internos que abarcan desde los 10 a 16 nanómetros; siendo lo suficientemente grandes para permitir el flujo de componentes tóxicos y ganar acceso al interior celular resultando en la alteración de gradientes iónicos, lisis osmótica y apoptosis (Uellner y col., 1997; Natarajan y Cowan, 1998; Suzuki y col., 2002; Podack, 2009).

El sistema del complemento es el principal sistema efector de la inmunidad innata (Li y col., 2007). Las funciones mediadas por los productos de activación del complemento incluyen fagocitosis y citolisis de patógenos, solubilización de los complejos inmunes e inflamación (Boshra y col., 2006). El complejo de ataque de la membrana o MAC, se ensambla a través de la unión secuencial de una molécula de cada componente del complemento C5b, C6, C7 y C8, y la incorporación de un número variable (6-16) de moléculas C9 hacia el complejo inicial. El complejo MAC final ya ensamblado, tiene la capacidad de eliminar bacterias mediante la formación de un poro en la bicapa fosfolipídica, así como crear una disrupción en la célula diana (Muller-Eberhard, 1986; Gasque, 2004). Los componentes terminales del complemento (TCC): C6, C7, C8 α , C8 β y el C9, son proteínas relacionadas estructuralmente que difieren en tamaño y complejidad. Poseen mucha similitud secuencial y cuatro motivos estructurales comunes que incluyen la trombospondina (TSP), el receptor de baja densidad de la lipoproteína (LDL-R), el precursor del factor de crecimiento epidérmico (EGFP) y el dominio MACPF (Li y col., 2007).

Otro grupo de proteínas que se incluye dentro de la superfamilia MACPF es el de las moléculas líticas pertenecientes a la familia de las toxinas mortales de las anémonas. Entre ellas, se encuentran la AvTX-60A, purificada a partir de los nematocistos de la especie *Actinaria villosa*, y las tres toxinas proteicas letales PstX-

60A, PsTX-60B y PsTX-20A identificadas en la anémona *Phyllo-discus semoni* (Nagai y col., 2002a, 2002b; Oshiro y col., 2004; Satoh y col., 2007). Sin embargo, no todas las proteínas que contienen dominios MACPF están implicadas en la invasión y defensa (Rosado y col., 2007; Lukoyanova y Saibil, 2008). Entre los miembros no líticos de la familia, destacan cinco moléculas multidominio denominadas astrotactinas que están involucradas en procesos de migración neuronal (Zheng y col., 1996). La astrotactina 2 (ASTN2) está relacionada con varias enfermedades del sistema nervioso como el autismo o la esquizofrenia (Lesch y col., 2008; Vrijenhoek y col., 2008; Glessner y col., 2009; Wilson y col., 2010). Otros como los miembros de la subfamilia BRINP, se expresan en el tejido neuronal y participan en la supresión de tumores (Kawano y col., 2004; Wright y col., 2004). Existen otras subfamilias MACPF que incluyen miembros que poseen funciones tanto líticas como no líticas (Rosado y col., 2007; Lukoyanova y Saibil, 2008). Por ejemplo, las proteínas de expresión de macrófagos (MPEG) de la esponja *Suberites domuncula* participan activamente en la destrucción de bacterias (Wiens y col., 2005). Mah y col. (2004) y Wang y col. (2008), describieron una MPEG en las especies de oreja de mar *Haliotis rufescens*, *H. corrugata* y *H. diversicolor*. Posteriormente, He y col. (2011) y Renault y col. (2011) caracterizaron un homólogo de esta proteína en *C. gigas*. Todos estos autores sugirieron que las proteínas MPEG descritas estaban implicadas en la respuesta inmune. Además, Podack y col. (2007) propusieron que el MPEG es una proteína formadora de poros pero esta hipótesis todavía no se ha confirmado. Estos resultados demuestran que la presencia de homólogos de MPEG en protóstomos es compleja puesto que no se han encontrado representantes de estos genes en *C. elegans* o *Drosophila*, sugiriendo la pérdida evolutiva de estos genes en insectos y nematodos. Estos estudios sugieren que el MPEG podría tener su origen antes de la divergencia de los protóstomos y los deuteróstomos (He y col., 2011).

Algunas proteínas de la superfamilia MACPF son conocidas por desempeñar funciones relacionadas con el desarrollo, y no tanto, por estar asociadas con la defensa inmune de los organismos. Por ejemplo, las proteínas tipo torso (TSL) están implicadas en el desarrollo embrionario de insectos (Martin y col., 1994). Estas proteínas son secretadas en las células del folículo de los polos anteriores y posteriores de los oocitos (Stevens y col., 1990; Martin y col., 1994; Rosado y col., 2008). Curiosamente, todas las secuencias anotadas en la base de datos GenBank como TSL corresponden a insectos. Del mismo modo, las apextrinas también toman parte en el desarrollo

embrionario. A diferencia de las TSL, el rango de organismos en el que se han identificado apextrinas es más amplio. Las secuencias disponibles en GenBank se refieren a cnidarios, equinodermos, cordados, moluscos y bacterias. La apextrina se identificó inicialmente en las vesículas secretoras de los huevos de erizo de mar (*Heliocidaris erythrogramma*). Se comprobó como a nivel funcional, la apextrina estaba implicada en la adhesión celular durante el desarrollo embrionario (Haag y col., 1999). Posteriormente, Huang y colaboradores, observaron que este gen era capaz de sobre-expresarse frente a una infección bacteriana en el protocordado *Amphioxus* (*Branchiostoma belcheri*) (Huang y col., 2007). Recientemente, Dheilly y colaboradores (2011) también obtuvieron niveles de expresión significativos de la apextrina en erizo de mar (*H. erythrogramma*). Aunque las apextrinas fueron descritas como proteínas de ataque a la membrana (Rosado y col., 2008), realmente se desconoce si poseen actividad litica (Dheilly y col., 2011). Asimismo, también se ha comprobado la presencia de homólogos de apextrina en el coral *Acropora millepora* donde podrían estar implicados en el proceso de metamorfosis de este organismo. De manera sorprendente, las apextrinas estaría ausentes en la anémona de mar *N. vectensis* (Miller y col., 2007; Forêt y col., 2010). En la base de datos GenBank hay disponibles más de 56 secuencias de proteínas homólogas a apextrinas en erizo de mar (*S. purpuratus*) lo que sugiere que esta proteína podría estar dotada de una gran cantidad de funciones que abarcan desde el desarrollo embrionario hasta la capacidad de eliminar patógenos (Dheilly y col., 2011). Los trabajos llevados a cabo hasta la fecha sobre apextrinas, aunque son relativamente pocos, sientan las bases sobre el posible papel funcional que podrían tener estos genes. Sin embargo, en ninguno de ellos se ha llevado a cabo una caracterización formal de las apextrinas. Otra proteína que contiene el dominio MACPF es la EPCS50, la cual se expresa en las células del cono ectoplacentario de los trofoblastos de la placenta (Hemberger y col., 2000). Las únicas tres secuencias que codifican para esta proteína están presentes en ratón (*Mus musculus*).

Dentro del reino Protista, las proteínas MACPF están presentes dentro del grupo de los Apicomplexa, *Paramecium* y *Tetrahymena*. Respecto a los Apicomplexa, el número de dominios MACPF varía a lo largo de los principales clados del phylum (Kafsack y Carruthers, 2010). La expansión de proteínas tipo perforina en *Plasmodium*, *Theileria* y *Babesia*, puede deberse a la necesidad de estos genes para adaptar sus funciones a las de sus hospedadores artrópodos y mamíferos. Hasta la fecha, se han

caracterizado cuatro genes con dominios MACPF en ese phylum (Kadota y col., 2004; Kaiser y col., 2004; Ishino y col., 2005; Ecker y col., 2007; Kafsack y col., 2009). Además del gran número de representantes MACPF en eucariotas, existirían dos miembros no eucariotas representados por el gen CT153 de las especies *Chlamidia trachomatis* y *Chlamidia pneumoniae* (Ponting, 1999). La región de mayor similitud entre los dominios MACPF no eucariotas y eucariotas, coincide con dos hélices α anfipáticas; zona que correspondería a la región de cruce de la membrana del componente del complemento 9 (Peitsch y col., 1990). Es probable que ésta sea la región del dominio que interactúe con las membranas. Una posible función del dominio MACPF del gen CT153 de *C. trachomatis* es la formación de poros de manera similar a lo observado en perforina y C9 (Tschopp y col., 1982; Liu y col., 1995) quizás facilitando la entrada del hospedador en las células. Se ha propuesto que estos genes han surgido mediante transferencia horizontal a partir de una fuente eucariota y que probablemente faciliten la adaptación de la bacteria al ambiente intracelular del hospedador (Wolf y col., 1999).

Las proteínas formadoras de poros pueden clasificarse en base a su función, mecanismo de penetración de la membrana, tamaño de los poros o subunidades formadoras de poros. Una de las clasificaciones más importantes es la que diferencia a estas proteínas según el tipo de estructuras formadoras de poros en el plano de membrana, y que distingue entre formadores de poros α y β (González y col., 2008). Esta clasificación pone de manifiesto la existencia de características comunes en la formación de poros y función de éstos, inherente a organismos ancestrales en términos evolutivos (Andreeva-Kovalevskaya y col., 2008). La perforina pertenece al grupo de formadores de poros β y a diferencia del componente del complemento C9, no emplea proteínas accesorias en su unión a la membrana (Podack y col., 1991) resultando en la existencia de una analogía entre los mecanismos usados por las citolisinas dependientes de colesterol (CDCs) y la perforina (Hadders y col., 2007). Las CDCs son una gran familia de toxinas formadoras de poros producidas por más de veinte especies bacterianas de los géneros *Clostridium*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Bacillus* y *Arcanobacterium*. El mecanismo formador de poros de estas toxinas posee dos características fundamentales: una dependencia absoluta de la presencia de colesterol de membrana y la formación de un gran poro, al igual que la perforina (Tveten, 2005).

El dominio MACPF es un motivo ancestral que está presente en cada uno de los dominios del árbol de la vida a excepción del grupo Archaea (Finn y col., 2008). El

número de trabajos disponibles en las bases de datos genómicas, revela que de todos los integrantes de la superfamilia MACPF, la perforina y los miembros del complemento son los genes que han recibido más atención por parte de la comunidad científica. Se han caracterizado homólogos de estas dos familias de genes en varios grupos como mamíferos (Lichtenheld y col., 1988; Shinkai y col., 1988; Youn y col., 1991), cefalocordados (Suzuki y col., 2002), aves (Mikrou y Zarkadis, 2010) y peces (Hwang y col., 2004; Li y col., 2007; Athanasopoulou y col., 2009).

En lo que se refiere a moluscos, tan sólo hay disponibles cuatro trabajos que caracterizan homólogos de una proteína MACPF en ostra del Pacífico (He y col., 2011; Renault y col., 2001) y en tres especies de oreja de mar (Mah y col., 2004; Wang y col., 2008). No existe referencia previa alguna de genes MACPF en *Mytilus spp.* Aunque en los últimos años se ha realizado un importante esfuerzo por obtener secuencias expresadas (ESTs), las cuales se han recopilado en bases de datos disponibles actualmente como la Mytibase (Venier y col., 2009), y en trabajos de descripción de genes inmunes (Pallavicini y col., 2008; Costa y col., 2009a; Gestal y col., 2010), existe un conocimiento limitado sobre los mecanismos implicados en la respuesta inmune contra patógenos en mejillones adultos así como durante la inmunocompetencia de los estadios larvarios. Numerosos trabajos sobre moluscos bivalvos han demostrado la vulnerabilidad de los estadios tempranos de desarrollo a las enfermedades bacterianas (Tubiash, 1965; Lauckner, 1983; Sindermann, 1990; Nicolas y col., 1992; Paillard y col., 2004; Gómez-León y col., 2005). Con el propósito de investigar el papel funcional de las proteínas MACPF en invertebrados marinos, se han caracterizado tres genes relacionados con esta familia y se ha estudiado su implicación durante el desarrollo larvario así como la existencia de una función inmune frente a patógenos, en el molusco bivalvo *Mytilus galloprovincialis*.

I.2 MATERIAL Y MÉTODOS

I.2.1 ANIMALES

Ejemplares de mejillones adultos de *Mytilus galloprovincialis*, fueron obtenidos de una planta comercial de depuración de moluscos localizada en la Ría de Vigo (NW de España). Los animales se mantuvieron a una temperatura de 15°C (temperatura

media registrada en su ambiente natural) en tanques con agua de mar filtrada y aireación. Los animales se alimentaron diariamente a base de una dieta constituida por microalgas de las especies *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* y *Skeletonema costatum*. Previamente a los experimentos, los animales se aclimataron a las condiciones experimentales del laboratorio durante una semana.

I.2.2 AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS MEDIANTE RACE

Se procedió, en primer lugar, a partir de dos librerías de ADN complementario (ADNc) elaboradas por Pallavicini y col. (2008), a la selección de dos secuencias parciales con elevada similitud al gen *apextrina* y una secuencia parcial similar al gen *perforina*. Las secuencias similares a *apextrina* se nombraron como *ApelB* y *ApelP*, basándose en su origen: librerías construidas con ARNs aislados de hemocitos expuestos a bacterias y poly I:C, respectivamente. Por otra parte, la secuencia que poseía mayor similitud a *perforina* se denominó *Macp*. Se llevó a cabo la amplificación de los genes mediante técnica RACE y para ello se amplificaron los extremos de ADNc (RACE) 5' y 3' usando el kit de amplificación de ADNc RACE SMART cDNA Amplification Kit (Clontech, USA). Se aisló el ARN total de los hemocitos de mejillón usando el reactivo Trizol en base a las instrucciones indicadas por el fabricante. Posteriormente se resuspendió en agua tratada con Dietil-pirocarbonato (DEPC) y se procedió a su almacenamiento a una temperatura de -80°C. La calidad total del ARN se confirmó por electroforesis mediante un gel de agarosa. El ADNc RACE 3' y 5' se sintetizó a partir de 1µg de ARN total usando la enzima BD PowerScript Reverse Transcriptase a una temperatura de 42°C durante 90 minutos y empleando para el ADNc 3' el cebador 3' CDS-A y para el ADNc 5' el cebador 5' CDS-A junto con el oligonucleótido SMART A II, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los extremos 3' y 5' de las secuencias de los diferentes genes se obtuvieron por PCR con el cebador A mix Universal y cebadores específicos que se diseñaron con ayuda del software Primer3 (v. 0.4.0) (Rozen y Skaletsky, 2000) (Tabla 1).

La enzima Taq DNA polymerase (TakaRa) se usó para amplificar con las siguientes condiciones de ciclo: 94°C durante 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de amplificación a 94°C durante 30 segundos, 67°C durante 30 segundos, 70°C durante 1,5 minutos y un paso final de extensión a 72°C durante 7 minutos. Los productos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de

etidio. Posteriormente se procedió a la clonación empleando el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y usando las células competentes DH5 α TM Competent Cells (Invitrogen).

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
<i>Apex-like</i> Mit Bact RACE5_ 5	TGCCTCCATCCTTCCTCCATCCAT
<i>Apex-like</i> Mit Bact RACE3_ 1	CCGGATCTCAAATTTGGCCAAGAGG
<i>Apex-like</i> Mit Poly RACE5_ 1	TGCCAGTTCTGAATCCTGAAGGACAG
<i>Apex-like</i> Poly RACE3_ 1	GGGATGACGAAGACCATGACAATGC
Macp Mit RACE5_ 1	CCAACATCCACCTTTCTGCCCATAGA
Macp Mit RACE5_ 2	CATTGGCCCCCAAATCTAACGGTAACAG
Macp Mit RACE3_ 1	AACGGAATATCGGCATGGCAACCTAC

Tabla 1. Secuencias de cebadores para amplificación RACE

El crecimiento de los cultivos bacterianos se realizó en placas de Luria-Bertani (LB), que contenían el antibiótico ampicilina, el agente inductor isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y el cromóforo 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal), el cual permite reconocer aquellas células que expresan la enzima β -galactosidasa, codificada en el gen lacZ del operón lac. Tras la transformación, se procedió a realizar la selección o screening visual de las colonias, mediante discriminación de colonias azul-blanco. Las colonias blancas fueron sometidas a screening nuevamente por PCR, usando cebadores específicos del vector M13. Finalmente, los clones positivos se secuenciaron usando los mismos cebadores.

I.2.3 ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FILOGENÉTICO

Para la obtención de la secuencia consenso de nucleótidos de cada gen se emplearon las aplicaciones ChromasPro (v.1.33) y CAP3 (Huang y Madan, 1999). En el caso de las secuencias proteicas se utilizaron las herramientas del Servidor de

Proteómica de ExPasy (EXPASY Proteomics Server). La secuencia consenso de cada proteína se comparó con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank a través de la herramienta BLAST. El programa Compute pI/Mw (Gasteiger y col., 2005) se usó para determinar el peso molecular y el punto isoeléctrico de las secuencias. La localización del péptido señal y los sitios de rotura se identificaron mediante el software Signal IP (Bendtsen y col., 2004) mientras que la presencia de los sitios de N-glicosilación se determinó a través del programa NetNGlyc (NetNGlyc 1.0 Server). El programa Pfam se empleó para estudiar la arquitectura de dominios de las secuencias (Finn y col., 2010). Respecto a la estructura secundaria, ésta se predijo en base a los modelos descritos por Peitsch y col. (1990) y Rosado y col. (2007). La estructura tridimensional se determinó usando el web server ESyPred3D (Lambert y col., 2002) y Antheprot 200 V6.0 software (Deleage y col., 2001). La proyección *helical wheel* se construyó usando el software EMBOSS pepwheel (EMBOSS pepwheel) a partir de 18 residuos, según el protocolo descrito por Wang y col. (2008). El análisis filogenético se basó en secuencias completas de aminoácidos de las proteínas ApelB, ApelP y Macp de mejillón y 53 secuencias adicionales, pertenecientes a la superfamilia MACPF, obtenidas de la base de datos GenBank. Se realizaron alineamientos de las secuencias usando para ello el software MAFFT (Katoh y col., 2005) y además, se construyó un árbol filogenético por el método Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) a través del software MEGA (Tamura y col., 2007). La estimación del soporte nodal se llevó a cabo usando el mismo programa con 10.000 réplicas *bootstrap*.

I.2.4 DISEÑOS EXPERIMENTALES PARA ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA

Se llevaron a cabo cinco experimentos en los que se analizó la expresión de los tres genes de estudio: ApelB, ApelP y Macp mediante PCR en tiempo real o cuantitativa. Los diseños experimentales de las muestras analizadas por PCR cuantitativa se recogen en la Tabla 2 y se explican de manera detallada en los siguientes apartados.

Apartado	Estadio	Tratamiento	Muestra	Tiempo
I.2.4.1	Larvario	No	Larvas a diferentes estadios larvarios	2h, 20h, 2d, 7d, 14d, 32d, 45d, 90d
I.2.4.2	Adulto	No	Pie, branquia, glándula, gónadas, hemocitos, manto, músculo, palpo	
I.2.4.3	Larvario	<i>V. anguillarum</i>	Trocófora, veliger, larva D, estadio juvenil	3h post-infección
I.2.4.4A	Adulto	<i>V. anguillarum</i>	Hemocitos, branquia, pie	1, 3, 6, 24h post-infección
I.2.4.4B	Adulto	PAMPs	Hemocitos	1, 3, 6h post-estimulación

Tabla 2. Resumen de las muestras analizadas por PCR cuantitativa

I.2.4.1 PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES DURANTE EL DESARROLLO LARVARIO

A. ESTADÍOS DE DESARROLLO DEL MEJILLÓN. Con el objetivo de obtener puestas de mejillón en el laboratorio y poder estudiar la expresión de los genes *ApelB*, *ApelP* y *Macp*, durante el desarrollo larvario, se tomaron parejas de mejillones maduros del tanque de aclimatación y se dispusieron en contenedores individuales a temperatura ambiente. Después de una hora, se indujo la puesta a través de choque térmico usando un flujo de agua de mar a 23°C en base al protocolo descrito por Lubet en el año 1959. Al cabo de dos horas de estimulación, se observó la liberación de los gametos. Los oocitos procedentes de una única hembra se fertilizaron con el esperma de un único macho. Los gametos se agitaron enérgicamente en un vaso de precipitados con el fin de conseguir la suspensión de los oocitos y esperma, facilitando así la fertilización. Finalmente, se obtuvieron tres puestas independientes, es decir,

procedentes de progenitores distintos. Una hora después de la fertilización, los embriones fueron trasladados a tanques de un volumen de 150 litros y a una densidad de 2 larvas/ml. Con el fin de evitar la proliferación bacteriana, diariamente se lavó y esterilizó todo el material en contacto con las larvas. Algunos tanques se acondicionaron previamente con una malla para facilitar la fijación de las larvas cuando éstas alcanzasen el estadio de pediveliger o asentamiento. Las larvas se criaron con una dieta mixta a base de *Isochrysis galbana* y *Phaeodactylum tricorutum*. Cada dos días, se realizó un cambio de agua y para ello se llevó a cabo un tamizaje de las larvas con la ayuda de mallas de un tamaño que varió entre 40µm y 100µm en base a los diferentes tamaños de la larva. La fertilización y crecimiento de los individuos tuvo lugar en agua de mar filtrada a 1µm, temperatura de 23°C y aireación. Las muestras larvarias de estudio, se tomaron al azar de cada acuario, a los siguientes intervalos post-fertilización: 2 horas, 20 horas, 3 días, 7 días, 14 días, 32 días, 45 días y 90 días. Asimismo, durante el desarrollo larvario de los individuos se tomaron fotografías en cada punto de muestreo utilizando para ello un microscopio Nikon Eclipse 80i.

B. EXPRESIÓN GÉNICA. Para la extracción del ARN total, se emplearon aproximadamente un millón de larvas de mejillón, desde los estadios de trocófora a larva D. En los últimos estadios larvarios, se recogieron aproximadamente 250.000 individuos. El ARN total se extrajo usando el reactivo Trizol (Invitrogen) en base al protocolo del fabricante y después, se trató con ADNasa I (Invitrogen). Los ADNc se sintetizaron usando la enzima Super Script III reverso transcriptasa (Invitrogen). Para la realización de la PCR en tiempo real o cuantitativa, se empleó un sistema Abi7300 Real Time PCR (Applied Biosystems) usando para ello 1µl de ADNc con 12,5µl de SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) y 0,5µl (10mM) de cada cebador específico. Los cebadores se diseñaron usando el software Primer 3 (v. 0.4.0) (Tabla 3) en base a las restricciones de PCR cuantitativa conocidas, es decir, el tamaño del amplicón, la temperatura de fusión, la diferencia entre cebadores, el contenido de guanina-citosina, la formación de autodímeros y dímeros cruzados.

Para el estudio de la eficiencia de las parejas de cebadores se realizaron cinco diluciones en serie de ADNc y se calculó la pendiente de la curva de regresión del nivel umbral (Cts) frente a la concentración relativa del ADNc (Livak y Schmittgen, 2001). Los valores de eficiencia para ApelB, ApelP y Macp fueron -3,58, -3,28 y -2,95, respectivamente.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
ApelB F	CTTCCAAGTGGAATTTTGATAGAA
ApelB R	GTCAAAGGAATGTCTGTTCTAGAGC
ApelP F	AGGAAAGGGGTTACTGTCCT
ApelP R	ACTACTGCTGCAGATCTGATGG
Macp F	CCAGGGAAAATTTGGAGGTC
Macp R	ATGCCTCATCTACCGTCTGTCTAC
Actin F	AACCGCCGCTTCTTCATCTTC
Actin R	CCGTCTTGCTGGTGGTA

Tabla 3. Secuencias de cebadores de PCR cuantitativa

También se llevó a cabo el análisis de la curva de disociación con el fin de comprobar la ausencia de amplificación de dímeros por parte de los cebadores. Las condiciones de los ciclos fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto. Los datos del nivel umbral

(Ct) se obtuvieron a través del método Ct, basado en la comparación entre el nivel de expresión del gen de estudio y un gen control o *housekeeping*, que para este trabajo se seleccionó a la actina de mejillón (Livak y Schmittgen, 2001).

El gen de actina se empleó para normalizar la cantidad de ARN inicial. Este gen mostró un nivel de expresión constante y no sufrió modulación alguna bajo las diferentes condiciones experimentales utilizadas en la presente memoria de tesis. El incremento de expresión se calculó dividiendo los valores de expresión estandarizada en los diferentes estadios entre los valores de expresión estandarizada a los 7 días post-fertilización. Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar de 3 muestras biológicas. Los datos se compararon empleando el test t de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0,05$.

I.2.4.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA EN TEJIDOS

Se procedió con la disección de nueve mejillones, y se extrajeron de manera meticulosa los siguientes tejidos: branquia, manto, gónada femenina, gónada

masculina, pie, glándula digestiva, músculo y hemolinfa. La hemolinfa se extrajo del músculo aductor posterior, usando una jeringa de 1ml dotada de una aguja de 25G. Se hizo un pool para cada tejido, de modo que se obtuvieron tres réplicas e inmediatamente se introdujeron en el reactivo Trizol (Invitrogen) para pasar a almacenarlas a -80°C hasta el momento de su uso. El aislamiento de ARN, la síntesis de ADNc y la posterior PCR cuantitativa se llevó a cabo siguiendo las condiciones descritas anteriormente. El gen actina se usó como gen control y el incremento de expresión se obtuvo dividiendo la expresión estandarizada de los diferentes tejidos por los valores de expresión estandarizada en pie. Los resultados se expresaron tal y como ya se indicó en el apartado anterior.

1.2.4.3 PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LARVAS INFECTADAS

Con el propósito de analizar la implicación de los genes *ApelB*, *ApelP* y *Macp* en la respuesta inmune de larvas de mejillón en distintos estadios larvarios, se realizó una infección bacteriana *in vivo* con *Vibrio anguillarum*. Varios autores han revelado que este agente bacteriano es el causante de importantes mortalidades en bivalvos (Disalvo y col., 1978; Tubiash y Otto, 1986). Los mejillones en estadio trocófora, veliger, larva D y pediveliger se obtuvieron tal y como se describió en el apartado 1.2.4.1. Para preparar el inóculo bacteriano de *V. anguillarum*, se hizo crecer la bacteria en un medio de agar tripticosa soja (TSA) con un suplemento de un 1% de NaCl, a temperatura ambiente. Las bacterias se resuspendieron en agua de mar estéril y filtrada (FSW), y se obtuvo un OD₆₂₀ de 0,033 (1,6x10⁷ unidades formadoras de colonia (ufc) *Vibrio*/ml). Después, las bacterias se inactivaron por calor durante 30 minutos a 100°C. Para realizar la infección bacteriana, se dispuso un número aproximado de 100 larvas de mejillón en placas de cultivo de seis pocillos (Falcon) con 8ml de FSW y 160µl de *V. anguillarum* inactivado. Asimismo, se incluyeron muestras control que consistieron en larvas de mejillón sin tratar. Las muestras se recogieron a las 3h post-infección y se procedió con la extracción del ARN. Se realizaron tres réplicas de las infecciones con larvas procedentes de tres fertilizaciones biparentales diferentes. El análisis de expresión de genes se llevó a cabo tal y como se describió previamente, estandarizando los niveles de expresión obtenidos en larvas infectadas a un estadio de desarrollo específico, con los niveles de expresión de las muestras no infectadas en el mismo estadio. Los niveles de expresión estandarizados de cada gen

en trocófora, veliger y larva D, se compararon con los niveles de expresión en el estadio juvenil.

1.2.4.4 PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN MEJILLONES ADULTOS EXPUESTOS A DIFERENTES ESTÍMULOS

A. ESTIMULACIÓN *IN VIVO*. Para analizar la implicación de *ApelB*, *ApelP* y *Macp* en la respuesta inmune de mejillón, a 48 mejillones adultos se les inyectaron 100µl de suspensión de bacteria viva de *V. anguillarum* (OD₆₂₀=0,033) en el músculo aductor. Los mejillones se mantuvieron a 15°C, y tras 1h, 3h, 6h y 24h post-infección, se extrajeron la hemolinfa, las branquias y el pie. En total se obtuvieron cuatro muestras por tejido, cada una de las cuales estuvo formada por tejidos procedentes de tres mejillones. Los controles de cada punto de muestreo incluyeron el mismo número de mejillones inyectados con PBS. Las muestras se conservaron en el reactivo Trizol (Invitrogen) y se procesaron siguiendo las condiciones descritas con anterioridad. Los cambios en el perfil de expresión del gen se analizaron por PCR cuantitativa tal y como se describió previamente.

B. ESTIMULACIÓN *IN VITRO*. Se analizó la respuesta inmune del mejillón adulto y se evaluó el efecto de estímulos externos sobre la expresión de *ApelB*, *ApelP* y *Macp*, en hemocitos de mejillón. Para ello, se estimularon hemocitos de mejillón con varios PAMPs. La preparación de los PAMPs tuvo lugar a partir de un stock comercial (Sigma-Aldrich) de soluciones de poly I:C, zimosán, lipopolisacárido (LPS) y ácido lipoteicoico (LTA) a una concentración de 1mg/ml. Para preparar la solución bacteriana de CpG, se creció *V. anguillarum* en TSA con un suplemento de NaCl 1% a temperatura ambiente. El ADN bacteriano se aisló usando un protocolo de fenolcloroformo y la concentración de CpG se ajustó a 1mg/ml. Se obtuvieron un total de 20 cultivos de hemocitos a partir de mejillones adultos. Para ello, se extrajo hemolinfa del músculo aductor de cinco individuos. Se usaron cuatro pooles (2,5 ml de hemolinfa por pool) en cada experimento. Los hemocitos se incubaron con una solución de PAMPs (concentración final 50µg/ml) y se realizaron muestreos a los siguientes tiempos: 1h, 3h, y 6h post-estimulación. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 15°C y se realizaron, al menos, dos réplicas. Las muestras se procesaron siguiendo las condiciones descritas anteriormente para analizar los cambios en los perfiles de la expresión del gen mediante PCR cuantitativa.

I.3 RESULTADOS

I.3.1 AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS MEDIANTE RACE

Se clonaron y secuenciaron ADNcs correspondientes al marco abierto de lectura completo (ORF) de los tres genes de mejillón homólogos a las proteínas formadoras de poros (GenBank: HQ709237, HQ709238, HQ709239). La secuencia del gen Apextrin tipo B (ApelB) mostró una longitud de 893 pares de bases, con un ORF de 654 pares de bases, y codificó una proteína de 217 aminoácidos. La secuencia de Apextrin tipo P (ApelP) tuvo una longitud de 924 pares de bases, con un ORF de 642 pares de bases, y codificó una proteína de 213 aminoácidos. La tercera secuencia previamente denominada MACPF-domain-containing protein (Macp), presentó una longitud de 1.803 pares de bases y su ORF fue de 1.731 pares de bases. La secuencia de nucleótidos traducida codificó una proteína de 576 aminoácidos.

I.3.2 ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FILOGENÉTICO

La comparación de las dos secuencias designadas como ApelB y ApelP con aquellas disponibles en la base de datos GenBank reveló que la mayor identidad correspondió a la apextrina de *B. belcheri* (E-values de $1e^{-46}$ y $2e^{-47}$ para la ApelB y ApelP, respectivamente). El programa Compute pI/Mw predijo pesos moleculares y puntos isoelectrónicos similares para los genes ApelB y ApelP de mejillón. El peso molecular de la proteína ApelB fue de 24,7 kilodaltons (kDa) mientras que el punto isoelectrónico fue de 8,32. ApelP tuvo un peso molecular de 24,4 kDa y su punto isoelectrónico fue de 8,42. Los aminoácidos de la posición 1 a la 16 presentaron una alta probabilidad de formar un péptido señal, con los sitios de rotura situados en la posición 16-17 para ambas proteínas (Figura 1).

Se observó una conservación de los residuos cisteína (Cys) en los genes tipo apextrina de mejillón respecto al resto de secuencias alineadas y también la presencia de un motivo WDDDED. Una secuencia repetitiva cuya estructura era WP-X3-Y-X8-CP apareció dos veces en cada secuencia. ApelB y ApelP no mostraron ningún sitio de glicosilación y el programa Pfam tampoco detectó ningún dominio conservado en las dos proteínas (Figura 1).

```

ApelB M.galloprovincialis -----MPSILTLVLTVSLA--- 14
ApelP M.galloprovincialis -----MRNMYILPLMISVV--- 14
Apex B.belcheri MIIGSSGLFGQNSLFLVLYESTLDGGSTQYWKVQKQFLDFTFFSIQVAGYAA 50
PRED N.vectensis -----
Apex PRED S.purpuratus -----MFVGTKVTPNLLKVVLIHAVLRCS 24

ApelB M.galloprovincialis -----HAVLWPKETYTLVKP 29
ApelP M.galloprovincialis -----CAVWMPRGYSLEPKS 29
Apex B.belcheri WVTSLNKDRSLQEVAEVIDTANTRIEQRVPLLEFYTKEMPRGYSGLPRT 100
PRED N.vectensis -----MCMWPAKYGLPKA 13
Apex PRED S.purpuratus -----AQIAMPVGYGLPKP 39
* * * * *

ApelB M.galloprovincialis KSGCFYE---WEGWQODNEDDSNSNYIFPNHQEFTFG-GMRFHYC 74
ApelP M.galloprovincialis KSGCFLG---WEGCYDDNEDIHNVDSYNHHEGIFG-RNTKLCYC 74
Apex B.belcheri NTGCFYAAANARLNGLVRRHHTEDDDSSNARIGGTHFDGQYQ-TMNDQKFC 149
PRED N.vectensis LSGCFATTLGLTWTGWRVYQDTEDFYGNKHAHSFALDASVYASLNKRKHF 63
Apex PRED S.purpuratus NSGCFTE---WSEGYRHTEDCNFGNQSDFLDDG-AQAQMYNFC 85
:*** * * * * :
* * * * *

ApelB M.galloprovincialis TKDAHSTSS--QWEPGNVCI LKQIS-CFPGESTGYIKWDDSDRNANS 121
ApelP M.galloprovincialis TKPTYSGSS---WPRGNVCIARKGGVCPSPGERTGSIKWDDSDHDNANS 120
Apex B.belcheri MKTDIAMGEG---NWPAQVCIYFKKGT-CVPGEQWGLKWDDSDDNKNS 195
PRED N.vectensis MKTDTKNDNARP--SWPAGVCIYKKGK-CPSGESSGWLKWDDEDIRNSNN 111
Apex PRED S.purpuratus MKTQSSLDG--E-AWPAQVCIYKKGK-CPSGESSGIFWDDSDSANINR 131
* * * * *

ApelB M.galloprovincialis KGGVLESGNFDNRNTLIYYCCRSDDGYMNGIDLEKNKPFYLLRYTS-FCQR 170
ApelP M.galloprovincialis KNGILPDGTYNRNTRLIYYCCRSDDGSSYSSVLTFSKPFYLYHYTSLCQR 170
Apex B.belcheri ASGVLPDGSYNRNTEIQCRRSDGSSVTFPLALPSKRPFLYFRFA-GCQM 244
PRED N.vectensis YCGILEPDSYGRNTEIYCCRSDDGSKTIFPLFETEFYFLAQQSASCCQ 161
Apex PRED S.purpuratus EG@TRDGYDHTIIFCCRNDDVTSQAISEKADREMLLR-FDSCCQ 180
* * * * *

ApelB M.galloprovincialis WKGMSVLEHAVLTDDEKFNANGOGSSHELK---TGGKNKLYCYCYKY 217
ApelP M.galloprovincialis WRGMSAREEFVKTDDEETHNNSADGGNHKK---T--DTTRIHVCYYS-- 213
Apex B.belcheri VADMVREWFWRDDEDDNANRYGAEHFD---QGRNRHRIHCYYS-- 289
PRED N.vectensis VQYAVATEWLRFDTEVDVNGDGYGSSYBYG---AGINDHTMHYCY-- 205
Apex PRED S.purpuratus WRGNTVTKEWFRWDEBSNNGDSQTDVHEYEGIQSGGENVRLNFCYAPD 230
* * * * *

```

Figura 1. Alineamiento de proteínas tipo apexrina. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas ApelB y ApelP, apexrina de *B. belcheri* y apexrinas predichas en *N. vectensis* y *S. purpuratus*. El péptido señal está subrayado y los sitios de rotura se indican en negrita y cursiva. Los aminoácidos conservados están sombreados. Los residuos de cisteína conservados están en negrita. Los dos motivos conservados se señalan dentro de cuadros.

En lo que a Macp se refiere, esta proteína mostró identidad con una perforina de *Paralichthys olivaceus* (E-value de $2e^{-06}$). La secuencia Macp codificó para una proteína con un peso molecular de 65,14kDa y un punto isoeléctrico de 8,93. Los primeros 21 aminoácidos codificaron para un péptido señal con un sitio de rotura situado entre las posiciones 21 y 22 (Figura 2). Además, presentó dos sitios de glicosilación en las posiciones 140 y 184. El programa Pfam predijo la presencia de un dominio MACPF entre los aminoácidos 125 y 324. La proteína Macp conservó el motivo cuya estructura es Y/WG-T/S-H-F/Y-X6-GG y que contienen todos los miembros de la familia MACPF pero hay que destacar que, en el caso de Macp, se observó una modificación en el primer aminoácido donde la tirosina/triptófano (Tyr/Trp) estuvo reemplazada por una fenilalanina (Phe) (Figura 2). Fuera del dominio MACPF, se localizó una región rica en cisteína, concretamente entre los residuos 397 y 566; y los residuos 502 y 536 se conservaron. La proteína Macp conservó cuatro residuos de

I. Estudio de la implicación de las moléculas formadoras de poros en la respuesta inmune y desarrollo del mejillón

glicina (G209, G210, G272 y G273) (Figura 2). Por otra parte, se observó que Macp no poseía ningún dominio de unión a la membrana dependiente de calcio (C2).

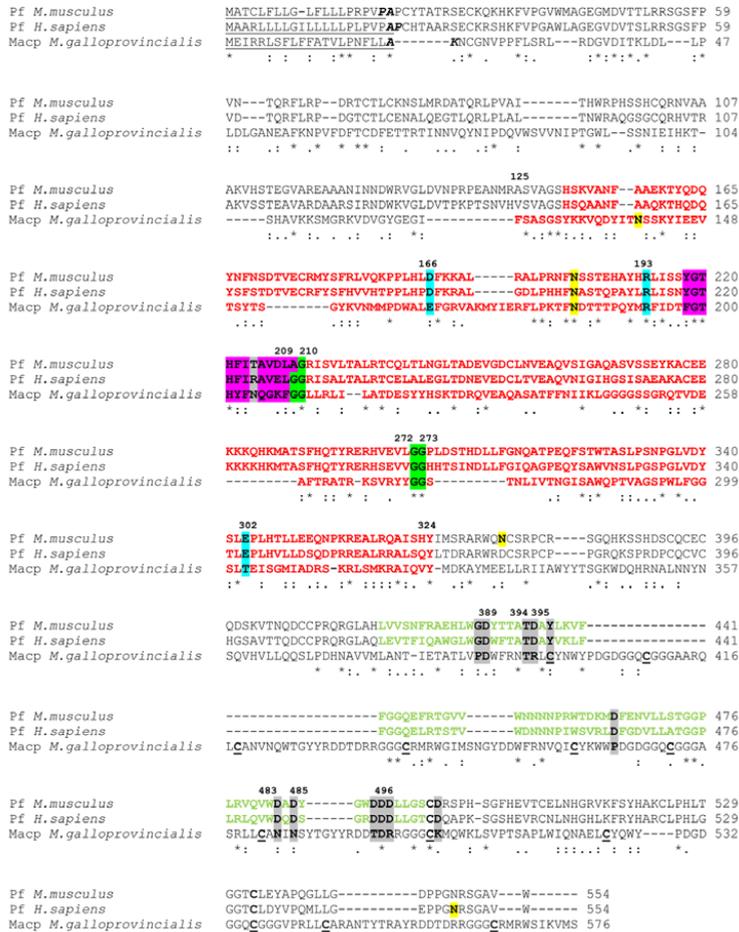


Figura 2. Comparación de la proteína Macp de mejillón junto con otras proteínas que contienen el dominio MACPF. Alineamiento de la secuencia Macp de *M. galloprovincialis* y perforinas de *M. musculus* y *H. sapiens*. El péptido señal está subrayado y los sitios de rotura aparecen en negrita y cursiva. El dominio MACPF y el dominio de unión al calcio (C2) aparecen escritos en letras rojas y verdes, respectivamente. Los sitios de glicosilación están sombreados en color amarillo. El motivo típico de las proteínas MACPF está sombreado en color rosa. Los residuos de cisteína situados en la region rica en cisteína, aparecen en negrita y subrayados. Los residuos clave importantes en la unión a la membrana dependiente de calcio así como las sustituciones, están sombreados en color gris. Los residuos implicados en la oligomerización están sombreados en azul, y las glicinas conservadas están sombreadas en verde.

Sin embargo, sí se detectó uno de los cuatro residuos de aspártico (Asp) que actúa como ligando del Ca^{2+} . Concretamente, el residuo de aspártico D389 (homólogo a D429 en *Mus musculus*) se conservó, mientras que los otros tres aminoácidos homólogos a D435, D483 y D485 en *M. musculus* fueron sustituidos por arginina (Arg) (R395) y asparagina (Asn) (N483 y N485), respectivamente (Figura 2).

La predicción de la estructura secundaria de Macp reveló que la proteína de mejillón podría contener tres regiones denominadas como $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, las cuales podían estar dentro o cerca del propio dominio citolítico α -turn- α de perforina (Figura 3).

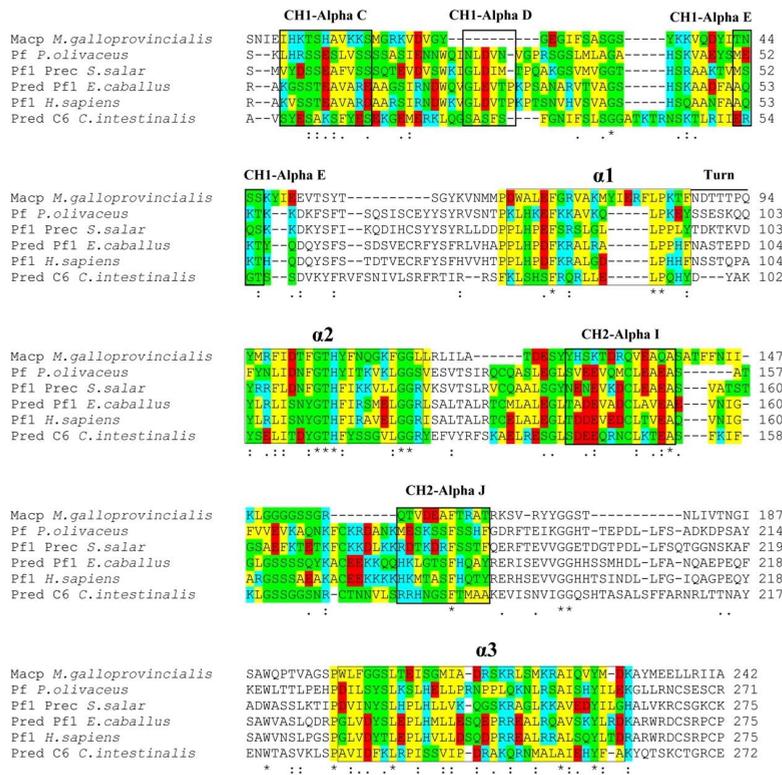


Figura 3. Alineamiento de la región que contiene la estructura en alfa-hélice del Macp. Además de Macp, se incluyen: perforina (Pf) de platija japonesa (*Paralichthys olivaceus*), precursor de perforina 1 (Pf1 Prec) del salmón atlántico (*Salmo salar*), perforina 1 predicha (Pred Pf1) de caballo (*Equus caballus*), perforina 1 (Pf1) de humano (*Homo sapiens*) y componente complemento 6 predicho (PredC6) de la ascidia (*Ciona intestinalis*). Se indica la estructura α -turn- α . $\alpha 1$, $\alpha 2$, y $\alpha 3$ aparecen señaladas con un cuadro. Las regiones CH1 (hélices C, D y E) y CH2 (hélices I y J) se indican también dentro de un cuadro. Los residuos incluidos en las hélices están sombreados en diferentes colores en base a sus características fisicoquímicas: (hidrofóbico: amarillo; hidrofílico: verde; básico: azul; ácido: rojo).

Además, se predijo la existencia de un dominio CH1 constituido por dos hélices (C y E) y otro dominio CH2 formado por otras dos hélices (I y J) (Figura 3).

El análisis de las características fisicoquímicas de los residuos que constituyen $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y CH1 y CH2, sugirió su naturaleza anfipática (Figura 3). La estructura tridimensional del Macp de mejillón reveló la localización de tres alfa- hélices ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) y una lámina β central de cuatro hebras ($\beta 1$ - $\beta 4$) rodeada por dos grupos de seis estructuras alfa-hélice (CH1 y CH2) (Figura 4A). Las proyecciones *helical wheel* confirmaron el carácter anfipático de las hélices $\alpha 1$ y $\alpha 2$ con CH1 y CH2 (Figura 4B).

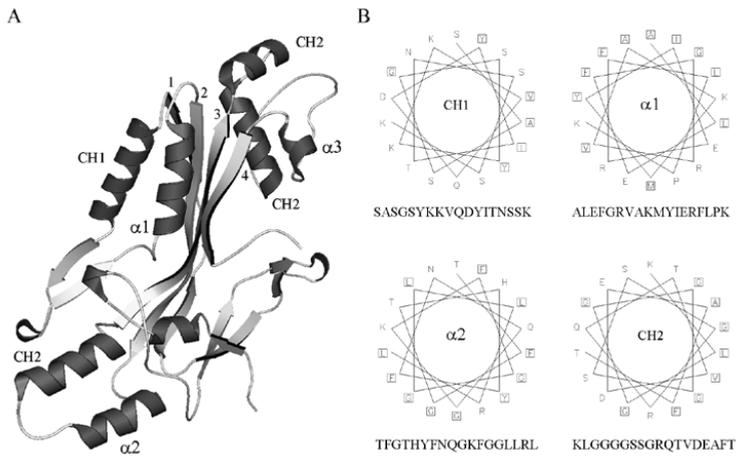


Figura 4. Estructura tridimensional del dominio MACPF de mejillón. A) Estructura de la proteína Macp formada por cuatro láminas β (señaladas 1-4), rodeadas por regiones anfipáticas (CH1, CH2), α -hélices ($\alpha 1$, $\alpha 2$) y láminas β . B) Representación de las proyecciones *helical wheel* de las hélices anfipáticas y residuos adyacentes de la secuencia Macp. Los residuos hidrofóbicos están señalados con cuadros.

El árbol filogenético NJ (Figura 5A) mostró clados específicos bien diferenciados a pesar que el valor de confianza relativo a las relaciones entre uno y otro clado, no fue muy elevado. Se observaron tres grupos bastante sólidos: el primero agrupó todos los componentes de las proteínas del sistema complemento y las perforinas. Las proteínas de las toxinas venenosas de las anémonas y las astrotactinas, constituyeron el segundo grupo, mientras que el tercero estuvo formado por las proteínas expresadas en macrófagos (MPEG) y las apextrinas. Las proteínas ApelB y ApelP de *M. galloprovincialis* se incluyeron en este último grupo. Se localizaron en conjunto con

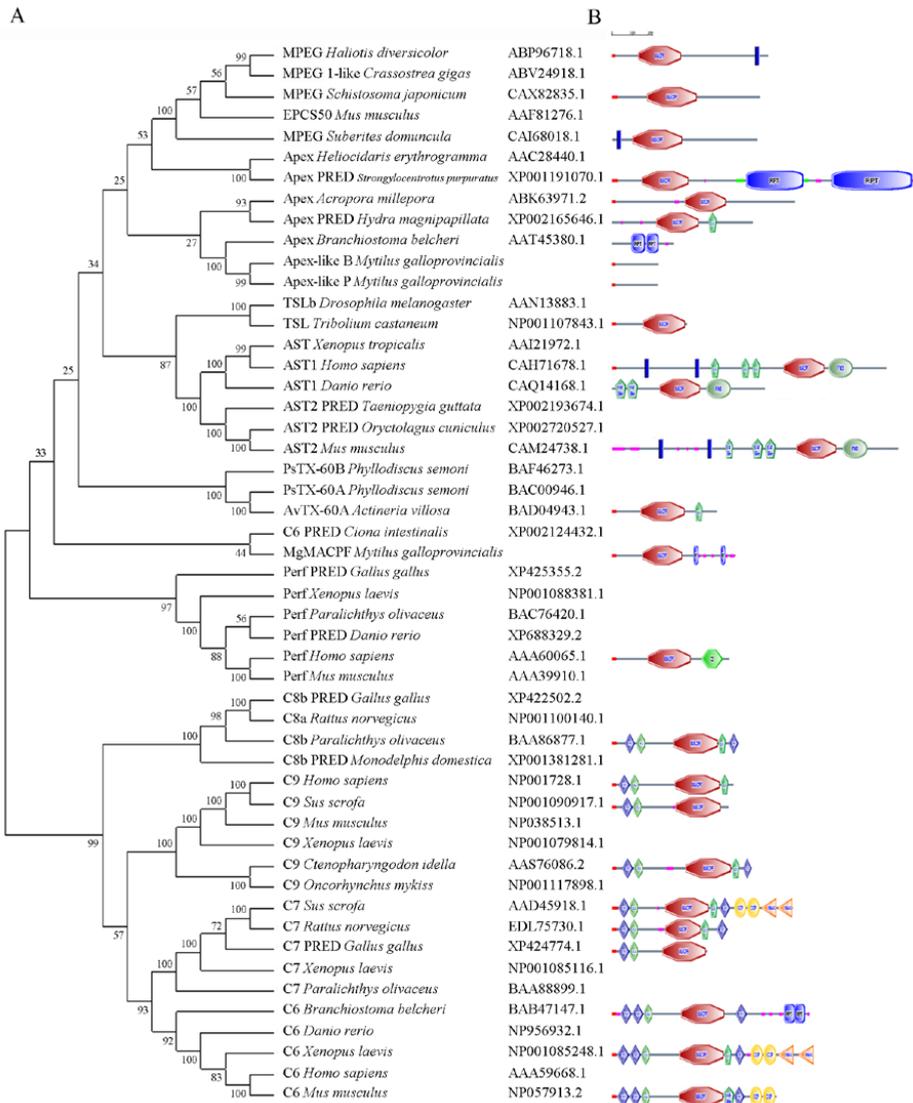


Figura 5. Relaciones filogenéticas entre las proteínas MACPF y la estructura de dominios. A) Arbol filogenético Neighbor-joining para ApelB, ApelP y Macp de *M. galloprovincialis*. MPEG: proteínas expresadas en macrófagos. EPCS50: gen expresado en células del cono ectoplacentario. Apex: apextrinas. TSL: proteínas tipo torso. AST: astrotactinas. TX-60: proteínas de las anémonas. Perf: perforina. C6, C7, C8 y C9: componente del complemento 6, 7, 8 y 9. Los números de las ramas representan los porcentajes *bootstrap*. B) Estructura de dominios de las proteínas tipo apextrina y Macp de mejillón y los miembros más representativos de la familia MACPF. Marcas de color rojo: Péptido señal. Hexágonos rojos: Dominio MACPF. Rectángulos azules verticales: Dominios transmembrana. Marcas rosa: Regiones de baja complejidad. Marcas verdes: Regiones "coiled-coil". Rectángulos horizontales azules: Repeticiones internas. Círculos verdes: Fibronectina tipo 3. Pentágonos: dominios tipo EGF. Hexágonos: Dominios de

calcio. Rombos azules: Repeticiones de trombospondina tipo 1. Rombos verdes: Receptores de lipoproteínas de baja densidad de dominio de clase A. Círculos amarillos: proteínas del componente del complemento. Triángulos naranjas: factor de complejo de ataque a la membrana.

las proteínas similares a apextrina sin dominios MACPF, con un valor de *bootstrap* del 99%. Pero al mismo tiempo, las proteínas tipo apextrina se situaron muy próximas a las proteínas con dominio MACPF como las apextrinas de otros organismos y las proteínas MPEG. Con un 78% de valor *bootstrap*, las proteínas del complemento y las perforinas, es decir, el primer grupo diferenciado, estuvo más próximo a las astrotactinas y las proteínas de las anémonas, integrantes del segundo grupo. La posición de la proteína Macp de *M. galloprovincialis* no es clara, dando la sensación de proteína transitoria, que estaría situada a medio camino entre las proteínas más simples, las proteínas tipo apextrina, y las más complejas, como las astrotactinas o perforinas. Asimismo, se hizo un análisis de la estructura de dominios más representativa de los diferentes miembros de la familia MACPF (Figura 5B). Las proteínas ApelB y ApelP de *M. galloprovincialis* no mostraron ningún dominio conservado, tal y como se observó para la apextrina predicha en el erizo *S. purpuratus* y en la anémona *N. vectensis*. Mientras que las proteínas MPEG y tipo torso (TSL) mostraron un único dominio MACPF, las perforinas y las proteínas del complemento conservaron una estructura multidominio. La perforina conservó el dominio MACPF además de un dominio de calcio (C2) (Figura 5B).

I.3.3 PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES DURANTE EL DESARROLLO LARVARIO

I.3.3.1 ESTADÍOS DE DESARROLLO DEL MEJILLÓN

Se estudió la morfología de diferentes estadios larvarios de *M. galloprovincialis* mediante observaciones microscópicas de las muestras tomadas a diferentes intervalos: 2 horas, 20 horas, 3 días, 7 días, 14 días, 32 días, 45 días y 90 días después de la puesta. A las 2 horas post-fertilización, todas las larvas se encontraban en el estadio de blástula y a las 20 horas alcanzaron el estadio de trocófora (Figura 6.1). La larva veliger apareció después de 3 días post-fertilización (Figura 6.2). Desde el día 7 al día 14, las larvas cambiaron de veliger a estadio larva D y larva umbonada. El día 10, las larvas crecieron considerablemente en tamaño, y las valvas mostraron la forma

característica D típica de la larva D (Figura 6.3). Después de los 11 días post-fertilización, se observaron larvas con morfología umbonada, y se estimó la finalización de este estadio a los 17 días post-fertilización (Figura 6.4). Desde el día 17 al 21, las larvas estuvieron en el estadio pediveliger (Figura 6.5), el cual precedió a la fijación y metamorfosis larvaria que tuvo lugar el día 20 post-fertilización. Se secretaron las proteínas para la formación del biso, desapareció el velo y se formaron los palpos labiales. Después de 32 días post-fertilización, todas las larvas estaban en el estadio larvario juvenil. Finalmente, los juveniles adquirieron la morfología típica adulta y éstos se fijaron a la malla dispuesta en los tanques, mediante el biso alcanzando así hábitos de vida bentónica propios de mejillones adultos (Figura 6.6).

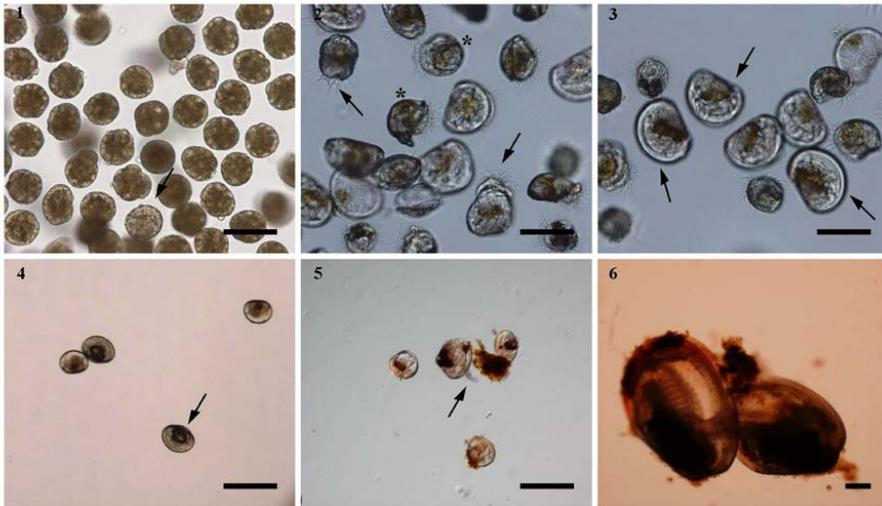


Figura 6. Descripción de los estadios de desarrollo larvarios de mejillón. 1) Estadio larvario de trocófora: Presencia de estructuras típicas, como formación de los anillos ciliares y flagelos centrales (indicados con una flecha). Escala 100µm. 2) Estadio de veliger: Las flechas indican el penacho apical de cilios y los asteriscos indican la glándula de la concha, responsable de la segregación de la primera concha larvaria. Escala de 100µm. 3) Larva D: Las flechas indican la forma característica en D de la concha larvaria. Un velo muy activo de cilios y un par de flagelos centrales se proyectan hacia afuera de las valvas. El estómago de color verde, debido a la reciente ingestión de fitoplancton, ocupa la mayor parte de la cavidad corporal. Escala de 100µm. 4) Larva umbonada: Crecimiento alométrico de la concha a nivel de la región del umbo (flecha). Las larvas se presentan más curvas y aparecen los músculos aductores y una mancha pigmentada en la región central justo debajo de las valvas. Escala de 200µm. 5) Larva pediveliger: Muestra un órgano pedal bien desarrollado continuamente extendido fuera de las valvas (flecha). Escala de 200µm. 6) Estadio juvenil: Caracterizado por la típica morfología adulta. Se observa un modo de vida bentónica tras la adhesión a la malla a través del biso. Escala de 200µm.

I.3.3.2 EXPRESIÓN GÉNICA POR PCR CUANTITATIVA

El análisis de nivel de expresión génica mostró que *ApelB*, *ApelP* y *Macp*, se expresaron de manera elevada, en los diferentes estadios de desarrollo (Figura 7). Dos horas después de la fertilización, cuando las larvas alcanzaron el estadio de blástula, el gen *ApelP* mostró el mayor nivel de expresión, alcanzando valores significativos superiores a 20.000 por encima del nivel registrado al día 7 post-fertilización. En este punto, *ApelB* se reguló positivamente de manera significativa pero con un valor de 2.000 por encima del valor de expresión obtenido a los 7 días post-fertilización. Sin embargo, *Macp* no se expresó en estos estadios. En el estadio de trocófora, la expresión del gen *ApelP* (Figura 7) disminuyó (valor significativo igual a 80 por encima del control), mientras que los niveles de expresión de *ApelB* alcanzaron los niveles máximos significativos (20.000 por encima del nivel de expresión registrado a día 7).

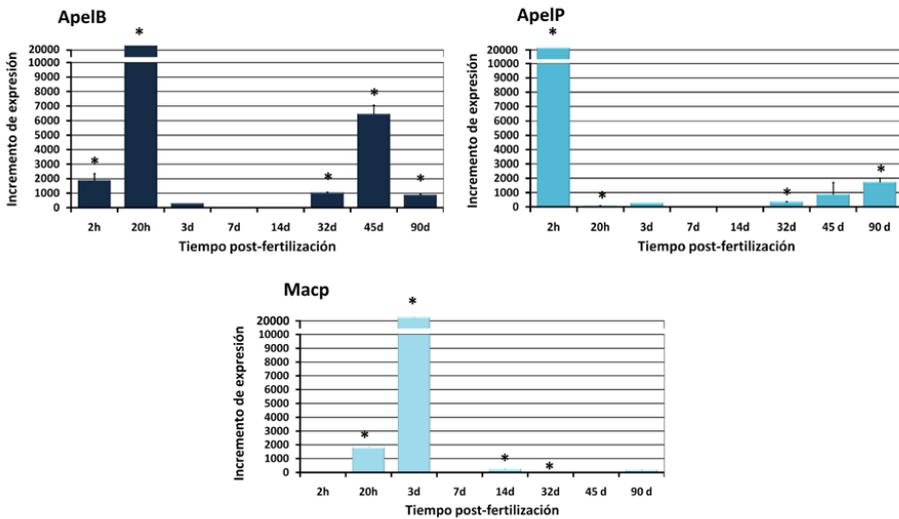


Figura 7. Expresión génica de *ApelB*, *ApelP* y *Macp* durante el desarrollo larvario de mejillón. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres muestras distintas. Las diferencias significativas de los niveles de expresión detectados a siete días post-fertilización se indican con un asterisco (*) ($p < 0,05$).

En este punto, empezó a expresarse el gen *Macp* (2.000 sobre el valor de expresión a día 7) y alcanzó su nivel máximo a los tres días post-fertilización (20.000 por encima del día 7, con diferencias significativas) cuando las larvas pasaron a estadio veliger. En

este estadio las proteínas tipo apextrina se expresaron a niveles más bajos (300 por encima del día 7). Las muestras tomadas a día 7 y 14 post-fertilización, cuando las larvas cambiaron a larva D y larva umbonada, mostraron los valores de expresión más bajos de los tres genes. A partir del día 32, las larvas se encontraron en el estadio juvenil post-larvario. Para éste y los intervalos posteriores (45 y 90 días), *ApelB* y *ApelP* estuvieron reguladas positivamente, a pesar de que los valores de expresión fueron más bajos que los niveles registrados a las 2 y 20 horas post-fertilización. A los 32 días post-fertilización, *ApelB* se expresó con un valor de 1.000 por encima del nivel basal y a los 45 días post-fertilización alcanzó un valor de 6.500 respecto a dicho nivel, con diferencias estadísticamente significativas (Figura 7). A día 32 y día 45 post-fertilización, *ApelP* fue significativamente diferente comparado con el nivel basal, registrando un nivel de expresión de 900 por encima del control a los 45 días post-fertilización (Figura 7). A los 90 días, sólo la *ApelB* mostró diferencias significativas, con un incremento de expresión de 880. En estos últimos puntos de muestreo, *Macp* registró diferencias no significativas (Figura 7).

I.3.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA EN TEJIDOS

El estudio de la expresión de genes en tejidos reveló que los niveles de expresión más elevados para los genes tipo apextrina y *Macp*, correspondieron a hemocitos y branquias (Figura 8). Concretamente, el valor de expresión para *ApelB* y *ApelP* en hemocitos fue de 1.000 y 150 (valores significativos), por encima del nivel de expresión registrado en pie, respectivamente. La expresión detectada en branquias fue más baja que en hemocitos, pero también alcanzó niveles elevados y significativos de entre 50 a 30 por encima del pie, para ambos genes tipo apextrina, respectivamente. *ApelB* se expresó significativamente en todos los tejidos (por encima de 1.000 sobre el nivel registrado en pie), excepto en glándula. Los niveles de expresión en manto y gónada masculina se situaron por encima de 100 respecto al valor de expresión el el tejido control. *ApelP* registró bajos niveles en gónada femenina, manto y palpo (de tan sólo un valor igual a 5 por encima del valor observado en pie). Los hemocitos y la gónada masculina mostraron los valores de expresión más bajos, alcanzando solamente valores de 100 y 1.000 por debajo de los registrados en el tejido de referencia (Figura 8).

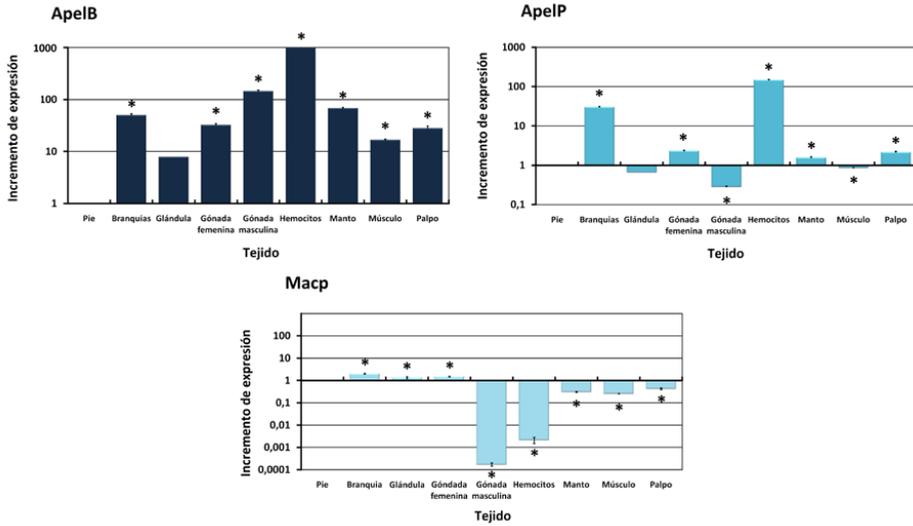


Figura 8. Expresión génica en tejidos de ApelB, ApelP y Macp. PCR cuantitativa de ApelB, ApelP y Macp en diferentes tejidos. Gónada f: Gónada femenina, Gónada M: Gónada masculina. Los resultados están representados como la media \pm desviación estándar de tres muestras diferentes. Las barras de error representan la expresión estandarizada de los genes de estudio, respecto a los niveles de expresión de actina. El asterisco (*) indica la presencia de diferencias significativas en comparación con los niveles de expresión detectados en pie ($p < 0,05$).

I.3.5 PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LARVAS INFECTADAS

Las larvas infectadas con *V. anguillarum* mostraron perfiles diferentes de expresión génica en base a sus estadios de desarrollo (Figura 9). ApelB mostró el valor significativo de expresión más alto en el estadio de trocófora (5 veces por encima del nivel control). En este estadio, la expresión fue la más alta de todos los genes en comparación con el estadio juvenil. Se registraron valores significativos durante los estadios veliger y larva D, en comparación con el estadio de referencia. ApelP se reguló de manera positiva a lo largo de todos los estadios de desarrollo larvarios, mostrando valores de expresión similares (variando desde 0,5 y 2,4 veces por encima del nivel de expresión en el estadio juvenil). En el estadio de larva D, se observaron diferencias significativas en comparación con el estadio de referencia. ApelP mostró valores de expresión significativamente más elevados que los otros genes en individuos juveniles.

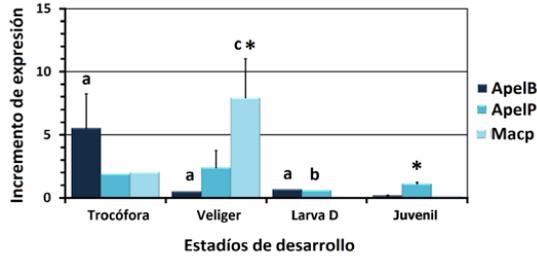


Figura 9. Estudio de expresión génica en larvas de mejillón infectadas con bacteria, a diferentes estadios de desarrollo. Expresión cuantitativa de ApelB, ApelP y Macp en diferentes estadios larvarios a las 3h de la infección con *V. anguillarum* muerto. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres muestras diferentes. Las barras de error indican la expresión relativa de cada gen en comparación con las muestras control sin infectar, previamente estandarizadas a los niveles de expresión de actina. (a–c) indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de la expresión de cada gen en cada uno de los estadios respecto al estadio juvenil. Los asteriscos (*) indican la existencia de diferencias significativas entre la expresión de un gen concreto (ApelB, ApelP o Macp) en comparación con los demás genes en el mismo estadio de desarrollo.

Macp registró la expresión significativa más elevada en el estadio de veliger. Este valor de expresión fue significativamente más alto (8 veces por encima del nivel control) que ApelB y ApelP en este estadio (Figura 9).

I.3.6 PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA EN MEJILLONES ADULTOS EXPUESTOS A DIFERENTES ESTÍMULOS

I.3.6.1 ESTIMULACIÓN *IN VIVO*

Para la realización de este experimento se tuvieron en cuenta los resultados previos de expresión génica en tejidos. Así, se seleccionaron los hemocitos, las branquias y el pie, debido a que fue en estos tejidos donde se obtuvieron los mayores niveles de expresión. Tras la estimulación bacteriana, estos tres tejidos mostraron un perfil de expresión génica diferente (Figura 10). En hemocitos, ApelB registró el valor máximo de expresión en comparación con los demás genes, a 1 hora post-estimulación, con un valor de 1.000 veces por encima del nivel control. A las 3 horas, la expresión disminuyó significativamente hasta las 6 horas post-estimulación, y en ese punto, hubo un aumento significativo que no fue suficiente para alcanzar el nivel de expresión del control. El nivel de expresión de ApelP aumentó con diferencias

significativas a las 3 y 6 horas respecto a la expresión registrada a 1 hora post-estimulación. El tercer gen, Macp, se reguló negativamente desde ese punto hasta las 6 horas, momento en el que se alcanzó el nivel de expresión del control, sin que existiesen diferencias significativas. El mayor incremento de expresión se registró a las 24 horas, con un valor de 50 veces por encima del nivel control (Figura 10).

En branquias, el perfil de expresión génica fue diferente. ApelB registró el mayor incremento de expresión significativo (9 veces respecto al control) a 1 hora post-estimulación. Desde este punto, se registró una disminución significativa de la expresión hasta alcanzar las 3 horas. A partir de aquí, y hasta las 6 horas, el nivel de expresión estuvo próximo al nivel control, con diferencias significativas en comparación con los valores registrados a 1 hora post-estimulación. Ya al final del experimento, Macp se reguló negativamente de manera significativa, alcanzando un valor mínimo de expresión de 0,032 veces por debajo del control, a las 24 horas post-estimulación. A pesar de que el gen ApelP también se moduló, los valores de expresión estuvieron más próximos a los registrados en los controles. La expresión de Macp, aumentó de manera significativa desde 1 hora, momento en el que se registró el valor más bajo de expresión (0,0006 por debajo del nivel control), hasta las 6 horas. En este punto, se registró el mayor incremento (próximo a 10.000 veces por encima del nivel basal) y mostrando diferencias significativas. Entre las 6 horas y las 24 horas, hubo un descenso significativo de la expresión (Figura 10).

Finalmente, ApelB se reguló de manera positiva y significativa en pie, entre 1 hora y 3 horas, cuando se registró, para este gen, el mayor valor de expresión (10 veces por encima del control). A partir de las 3 horas, la expresión disminuyó hasta 24 horas, momento en el que se alcanzó el nivel más bajo de expresión (0,07), con diferencias significativas. ApelP se reguló de manera positiva y significativa, solamente a las 24 horas, con un valor de expresión de 7, siendo el valor más alto para este punto de muestreo. Entre 1 hora y 3 horas post-estimulación, se detectó un aumento significativo en la expresión del gen Macp, registrándose así, el nivel de expresión más alto a las 3 horas post-estimulación (1.600 veces por encima del control) respecto a los otros genes. Este gen mantuvo una elevada expresión hasta el final del experimento (Figura 10).

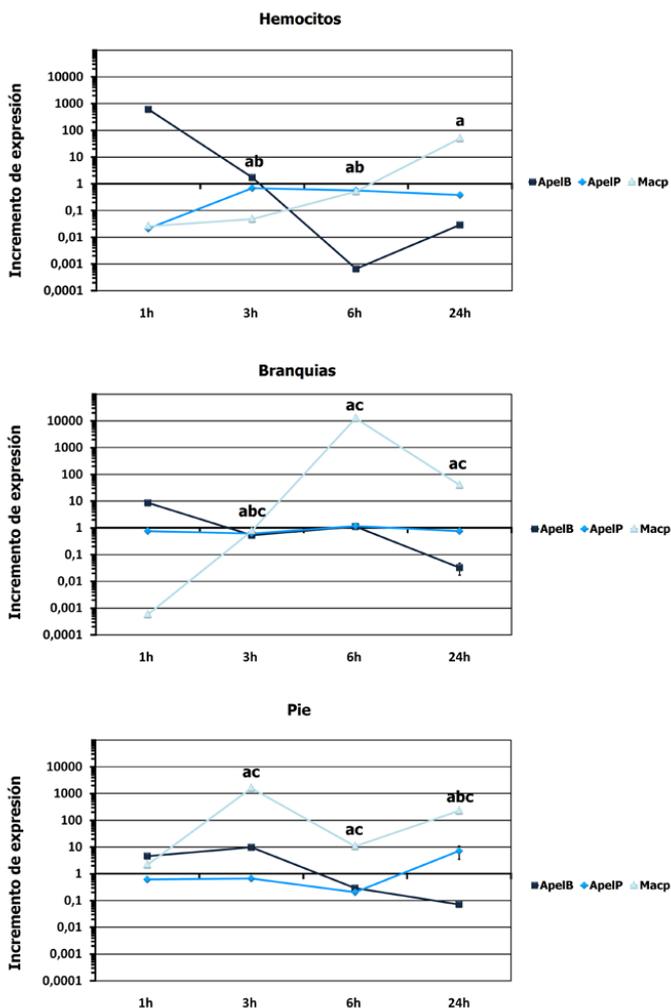


Figura 10. Estudio de genes *ApelB*, *ApelP* y *Macp* en tejidos de individuos adultos bajo infección bacteriana. Expresión cuantitativa de los genes en hemocitos, branquias y pie después de una infección bacteriana con *V. anguillarum* a 1h, 3h, 6h y 24h. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de cuatro muestras (a–c). Diferencias significativas para ($p < 0,05$) de *ApelB*, *ApelP* y *Macp* en base a los resultados obtenidos a 1h post-infección.

I.3.6.2 ESTIMULACIÓN *IN VITRO*

Para analizar el papel de las proteínas formadoras de poros en la respuesta inmune contra infecciones bacterianas, víricas y fúngicas; los hemocitos de mejillón fueron tratados con varios (PAMPs) (Figura 11). El tratamiento con lipopolisacáridos bacterianos de las bacterias Gram negativas (LPS) imitó una infección bacteriana e indujo un aumento significativo del gen *ApelB*, entre 1 y 3 horas post-estimulación, alcanzando el máximo incremento de expresión (1,5 veces por encima del nivel control) a las 6 horas después del tratamiento. La expresión de *ApelP* aumentó durante

el curso de tiempo variando desde un valor mínimo a 1 hora post-estimulación (0,7 por debajo del nivel control) hasta el mayor incremento de expresión significativo a las 6 horas post-estimulación (2 veces por encima del nivel control).

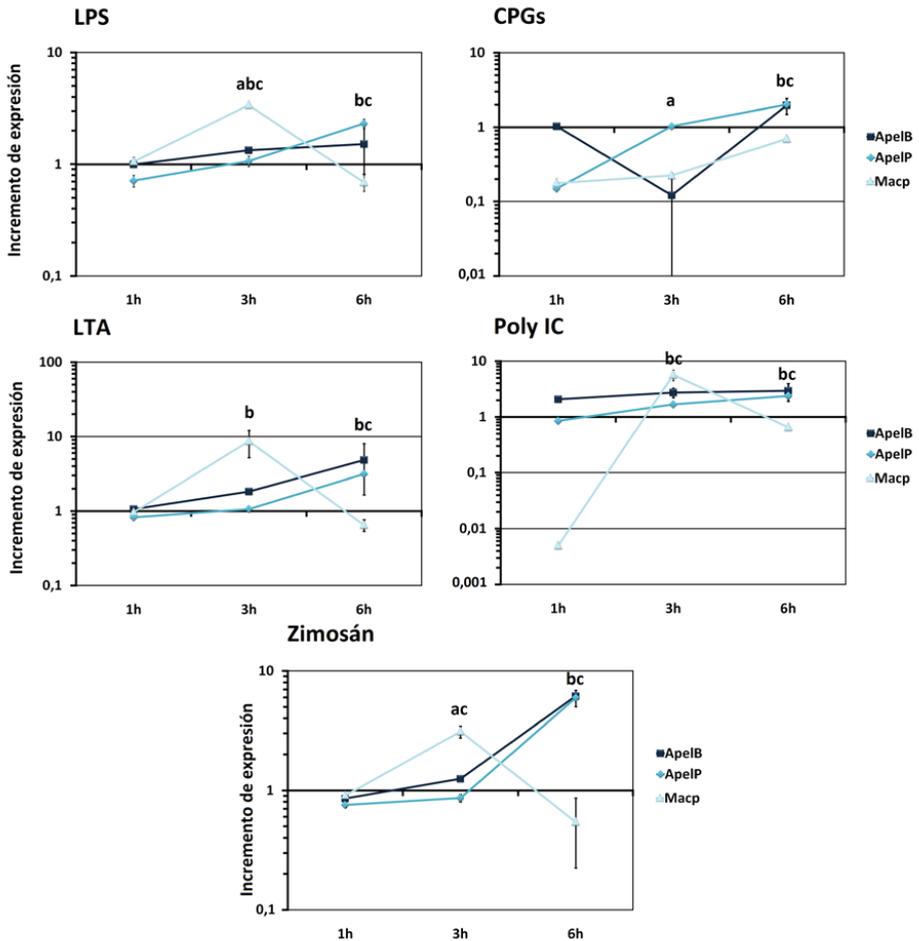


Figura 11. Análisis de expresión de genes en hemocitos de mejillones adultos estimulados *in vitro* con PAMPs: LPS, CPGs, LTA, Poly I:C y Zimosán. Modulación de ApelB, ApelP y Macp en hemocitos tratados *in vitro* con PAMPs a 1h, 3h y 6h post-estimulación. Los resultados están representados por la media \pm desviación estándar de los cuatro pools experimentales de hemocitos. (a–c) indican diferencias significativas para ($p < 0,05$) de ApelB, ApelP y Macp, respectivamente en base a los resultados obtenidos a 1h post-estimulación.

Macp se reguló de manera positiva y significativa a las 3 horas post-estimulación, alcanzando el mayor incremento de expresión (3,5 veces por encima del nivel control). Posteriormente, se registró una disminución significativa entre las 3 y 6 horas situándose en valores más bajos que el control (0,7 por debajo del control) (Figura 11).

El tratamiento con ADN procedente de bacterias (CPGs), que simuló una infección bacteriana, indujo una respuesta diferente. ApelB se reguló negativamente de manera significativa hasta el intervalo de 3 horas (0,1 por debajo del control), cuando se alcanzó el valor mínimo con diferencias significativas. La expresión aumentó desde las 3 horas hasta las 6 horas registrando el máximo incremento de expresión en este punto (2 veces por encima del nivel control). ApelP se reguló negativamente 1 hora después del tratamiento. La expresión aumentó durante el curso de tiempo, situándose en el nivel control a las 3 horas post-estimulación, con diferencias significativas, y registró la máxima expresión significativa a las 6 horas post-estimulación (2 veces por encima del nivel control). Macp se reguló negativamente durante todo el experimento, registrando el mayor nivel de expresión a las 6 horas (Figura 11).

El tratamiento con ácido lipoteicoico de las bacterias Gram positivas (LTA), que al igual que los dos tratamientos anteriores también simuló una infección bacteriana; dio lugar a un aumento de la expresión de ApelB, entre 1 y 6 horas, registrando el mayor incremento de expresión (5 veces por encima del nivel control). ApelP también aumentó su expresión durante el curso de tiempo, mostrando el valor más alto a las 6 horas, con diferencias significativas. Macp se expresó solamente de manera elevada a las 3 horas post-estimulación (9 veces por encima del nivel control). El valor de expresión mínimo significativo se registró a las 6 horas. El tratamiento con poly I:C sirvió para recrear una infección viral. Bajo un tratamiento de este tipo, ApelB se expresó siempre, a lo largo de todo el experimento, variando desde las 2 a las 3 veces por encima del control. La expresión de ApelP fue significativamente mayor entre las 3 y las 6 horas post-estimulación, alcanzando el máximo valor (2 veces por encima del nivel control) al final del experimento. Macp se reguló negativamente (valor igual a 500 por debajo del nivel control) a 1 hora post-estimulación. A las 3 horas, aumentó su nivel de expresión alcanzando el mayor valor significativo con un incremento de expresión de 6 veces respecto al control. Al final del experimento, registró una regulación negativa y significativa (0,65 por debajo del nivel control) (Figura 11). Por último, el tratamiento con zimosán simuló una infección fúngica (Figura 11) e indujo

cambios similares en la expresión de ambos genes tipo apextrina. La expresión de ApelB y ApelP, aumentó durante el curso de tiempo. La expresión de ApelB se incrementó significativamente a las 3 horas, y posteriormente, a las 6 horas registró la mayor respuesta (6 veces por encima del nivel control). ApelP se reguló negativamente a 1 hora y 3 horas y entonces a las 6 horas, alcanzó una regulación positiva y así su máxima expresión. A las 3 horas, se observó una regulación positiva de Macp, con diferencias significativas (3 veces por encima del control) registrando el valor de máxima expresión. Sin embargo, a las 6 horas post-estimulación registró una modulación negativa y significativa (valor de 0,5 por debajo del control) (Figura 11).

I.4 DISCUSIÓN

En el presente capítulo, se describen las secuencias de tres moléculas susceptibles de ser incluidas en la familia de las moléculas formadoras de poros: dos proteínas tipo apextrina, que se han denominado ApelB y ApelP, y una proteína cuya estructura está caracterizada por la presencia de un dominio MACPF, nombrada Macp. Hasta la fecha, y en base a las diversas fuentes bibliográficas consultadas, se puede decir que existen solamente dos descripciones de una proteína formadora de poro en un molusco bivalvo. Se trata del gen MPEG identificado en la ostra del Pacífico (*C. gigas*) y descrito en dos publicaciones distintas del año 2011, por los autores He y colaboradores y Renault y colaboradores. Existen diversas secuencias de ostra (*C. gigas* y *C. virginica*) que contienen un dominio MACPF, pero no son secuencias completas sino parciales (Roberts y col., 2009; Renault y col., 2011).

La estructura de dominios observada en las proteínas ApelB y ApelP fue similar a la de la apextrina de *B. belcheri* (Huang y col., 2007) o a las proteínas predichas en el erizo *S. purpuratus* y en la anémona *N. vectensis*, carentes todas ellas de dominio MACPF. Todas las secuencias poseen dos motivos de señalización comunes, uno de los cuales, presenta una estructura que se repite dos veces. La presencia de estas repeticiones sugiere que podría tratarse de elementos estructurales característicos de las apextrinas que carecen de dominios MACPF. En lo que a Macp se refiere, este gen mostró un tamaño similar a las perforinas ya caracterizadas en mamíferos y peces (Shinkai y col., 1988; Hwang y col., 2004). Sin embargo, si se compara la identidad entre Macp y las perforinas mencionadas, el valor es bajo, al igual que los niveles

descritos entre las proteínas pertenecientes a la familia MACPF, cuyo porcentaje se sitúa entre el 10 y el 20% (Ponting, 1999; Rosado y col., 2007; Slade y col., 2008). Además, Macp conservó dos sitios de glicosilación, al igual que las perforinas descritas en humano (*H. sapiens*), ratón (*M. musculus*) y platija japonesa (*P. olivaceus*) (Shinkai y col., 1988; Byoung y col., 1989; Hwang y col., 2004). Hay que destacar que los dos sitios de glicosilación de Macp se localizaron dentro del dominio del complejo de ataque a la membrana (MACPF), a diferencia de la perforina de humano y ratón, donde un solo sitio de glicosilación se situó dentro de dicho dominio. La característica estructural más importante de la proteína Macp es la presencia del motivo cuya estructura: Y/W-G-T/S-H-F/Y-X6-GG, está presente en todos los miembros MACPF (Ponting, 1999; Rosado y col., 2007). En Macp la primera tirosina (Tyr) está sustituida por una fenilalanina (Phe). Un cambio aminoacídico similar fue observado en la perforina de la platija japonesa (Hwang y col., 2004) y MPEG de la oreja de mar (*H. diversicolor*) (Wang y col., 2008). La proteína Macp también contiene cuatro sitios de residuos glicina (Gly) situados en el dominio MACPF que ya han sido descritos en otras moléculas como las citolisinas dependientes de colesterol (CDCs) y las proteínas MACPF (Rosado y col., 2007). Además, posee una región rica en cisteínas situada estructuralmente, a continuación del dominio MACPF (Shinkai y col., 1988; Byoung y col., 1989; Mah y col., 2004; Wang y col., 2008). El dominio de unión al calcio (C2), responsable de la unión de la perforina a las membranas de las células diana y la activación lítica de esta proteína (Blumenthal y col., 1984; Young y col., 1987; Tschopp y col., 1989; Voskoboinik y col., 2005;), no estuvo presente en el Macp de mejillón. Sin embargo, sí se conservó uno de los cuatro residuos de ácido aspártico (Asp) considerados por ser un ligando directo del calcio dentro del propio dominio C2 (Voskoboinik y col., 2005). Cabe destacar que un importante grupo de residuos implicados en la unión a la membrana dependiente de calcio se sustituyó por otros residuos en Macp. Como excepción dentro de este grupo, sí se conservó la treonina (Thr) 394 también presente en especies de organismos mamíferos (Urrea-Moreno y col., 2009), y el ácido aspártico (Asp) 496 (Voskoboinik y col., 2004). Las características fisicoquímicas de los aminoácidos sustituidos podrían, aparentemente, no alterar la actividad citotóxica de la perforina (Voskoboinik y col., 2004, 2005; Urrea-Moreno y col., 2009).

Respecto a los aminoácidos implicados en los procesos de oligomerización y formación del poro, Baran y col. (2009) describieron los residuos arginina (Arg) 213 y

el ácido aspártico (Asp) 191, como residuos de gran importancia. Estos autores también resaltaron la relevancia de un residuo ácido situado en la posición 191 y el aminoácido básico de la posición 213; puesto que ambos estarían implicados en el mecanismo de oligomerización de la perforina. Macp sí conservó la posición del residuo de arginina (Arg) 193 y el residuo ácido glutámico (Glu) en la posición 166.

En base a los modelos usados por Peitsch y col. (1990) y Rosado y col. (2007) para describir la estructura secundaria de las proteínas MACPF; se determinaron las regiones CH1 y CH2 de Macp. Este primer modelo identificó dos alfa hélices situadas en la zona más conservada del dominio MACPF de la proteína Macp tal y como se describió previamente en el C9, perforina y MPEG (Lichtenheld y col., 1988; Persechini y col., 1992; Spilsbury y col., 1995; Mah y col., 2004; Wang y col., 2008). Esta característica estructural presenta una importancia considerable puesto que esta región podría participar en el proceso de ensamblaje de monómeros en el poro (Baran y col., 2009; Podack, 2009). A diferencia de otras proteínas, Macp no contiene ninguna hélice D, la cual sí se encuentra en el dominio CH1 de otras proteínas, como la perforina (Rosado y col., 2007). Macp tan sólo conservó las hélices C, E, I y J, sugiriendo una posible naturaleza de carácter anfipático. El modelo empleado para la construcción de la estructura tridimensional de Macp, mostró una baja identidad (13,8%); aún así, la estructura que se ha obtenido, es similar a la descrita previamente para otras proteínas MACPF (Hadders y col., 2007; Rosado y col., 2007, 2008; Slade y col., 2008). Respecto a la estructura helicoidal de $\alpha 1$, $\alpha 2$, CH1 y CH2; la posición de los aminoácidos enfrentados hidrofóbicos e hidrofílicos sugiere la existencia de una naturaleza anfipática.

Tras la realización del análisis filogenético, se observa que las proteínas ApelB, ApelP y Macp se localizan en diferentes grupos dentro del árbol, revelando que pertenecen a grupos distintos dentro de la familia MACPF. ApelB y ApelP se agrupan con otras apextrinas como las proteínas predichas en el erizo *S. purpuratus*, la proteína predicha en *N. vectensis* o la apextrina de *B. belcheri*. Todas ellas carecen de dominio MACPF. La estructura más simple, respecto a otras proteínas, presente en ApelB y ApelP de mejillón, contrasta con la arquitectura más compleja del C6, que posee diez dominios diferentes como las repeticiones trombospondin tipo 1, o las proteínas del componente complemento (CCP) que interactúan con el complejo de ataque a la membrana (Kimura y Nonaka, 2009). Las proteínas MPEG y TSL conservan un único dominio MACPF. Debido a que las apextrinas, Tx60A y MPEG están presentes en

metazoos inferiores (Hemrich y col., 2007), y representan la estructura de dominios más simple, se sugiere que las proteínas ApelB y ApelP de mejillón son formas primitivas de la familia MACPF.

La perforina conserva un dominio MACPF además de un dominio C2 dependiente de calcio, mientras que la proteína Macp de mejillón, posee solamente un dominio MACPF. Este hecho revela que Macp podría representar una proteína intermedia o a medio camino entre las formas más primitivas y otras más evolucionadas, dentro del grupo de las proteínas MACPF. En el caso de proteínas diferentes a las de mejillón, el hecho de que MACPF se asocie con otros dominios, podría constituir un mecanismo de regulación del dominio MACPF por parte de los nuevos dominios tal y como fue propuesto para los componentes del complemento (Kimura y Nonaka, 2009).

El análisis funcional de los tres genes de estudio, confirma que los genes tipo apextrina, ApelB y ApelP, se regulan de manera positiva durante el desarrollo larvario de mejillón, alcanzando los niveles máximos de expresión cuando las larvas tienen un tiempo de vida de 2 y 20 horas (post-fertilización), respectivamente. A las 2 horas las larvas sufren segmentación (Bayne, 1976), mientras que a las 20 horas, se encuentran entre la forma de gástrula y el estadio de trocófora. Los niveles de expresión tan elevados que presentan los genes tipo apextrina, en estadios larvarios tempranos, ya fueron observados anteriormente en larvas de erizo que se encontraban en el estadio de gástrula (20 horas post-fertilización) (Minsuk y Raff, 2002) y en cnidarios (Miller y col., 2007). Respecto al tercer gen Macp, éste se expresa más tarde que los otros dos genes, alcanzando su máximo valor de expresión cuando las larvas presentan tres días de vida (post-fertilización), estadio en el que hace su aparición el velo, órgano asociado a las actividades natatorias de las larvas y que también es empleado en la captura de partículas alimenticias (Bayne, 1976). Haag y col. (1999) describieron que tras los estadios iniciales de desarrollo, el gen HeET-1 descrito en el erizo *H. erythrogramma*, sufre una reducción de la expresión desde las 36 horas de vida hasta una hora después de la metamorfosis (juveniles de erizo con 13 días de vida) momento en el que se detecta señal de expresión de HeET-1. ApelB y ApelP siguieron la misma cinética y su expresión disminuyó hasta el día 14 de vida. Es posible que antes de la metamorfosis dejase de haber expresión, de manera similar a lo que observaron Haag y col. (1999). Esto podría indicar que la expresión génica temprana es debida al material materno, tal y como ha sido previamente descrito en ostras (Tirapé y col.,

2007) y erizos de mar (Haag y col., 1999). La degradación del ARN materno en posteriores estadios podría explicar la disminución de la expresión del gen asociado a la metamorfosis (Davidson, 1986). A diferencia de *ApelB* y *ApelP*, *Macp* se expresó a los 14 días de vida, antes de la metamorfosis. Tirapé y col. (2007) averiguaron que el gen *Cg-timp*, un miembro del tejido inhibidor de metaloproteasas, mostró una fuerte inducción durante los estadios *veliger* y *pediveliger* al igual que *Macp*. Estos autores sugirieron que este gen podría estar implicado en la remodelación de tejidos e incluso podría desempeñar alguna función durante la metamorfosis, cuando tienen lugar los principales cambios morfológicos. En los estadios más tardíos, se detectó un aumento de la expresión del gen. Cuando la larva alcanzó el estadio juvenil (45 días post-fertilización), ambas *ApelB* y *ApelP* se expresaron de nuevo. Sin embargo, *Macp* no se expresó de manera significativa hasta los 90 días de vida larvaria. *Macp* mostró una expresión diferente en los estadios finales, sugiriendo que esta proteína podría estar regulada bajo mecanismos distintos al igual que se describió para otros genes relacionados con el sistema inmune en ostra (Tirapé y col., 2007). Mitta y col. (2000b) revelaron que los péptidos antimicrobianos, como la mitilina B y el péptido tipo defensin (MGD2), se expresaron desde la metamorfosis (día 13) hasta el asentamiento de la fase post-larvaria (día 32), o desde el día 25 al día 32. Dado que no hubo expresión de péptidos antimicrobianos en los estadios primarios del desarrollo larvario, los autores sugirieron que la maduración de las funciones inmunes se alcanza durante la metamorfosis.

El análisis de expresión de genes en tejidos de mejillón adulto mostró que *ApelB* y *ApelP* se expresan de manera significativa en hemocitos, sugiriendo una implicación en la defensa del hospedador, por parte de estos genes. *Macp* registró los niveles de mayor expresión en branquia, algo que también fue observado por Hwang y col. (2004) en perforina de la platija japonesa. La alta expresión de *Macp* en branquia indica el papel defensivo de este órgano. La cuantificación de la expresión de *ApelB*, *ApelP* y *Macp* tras una infección bacteriana reveló que la transcripción de estos genes se activa dependiendo de los estadios de desarrollo. Es decir, mientras que *ApelP* se reguló siempre de manera positiva, los valores de expresión más altos para *ApelB* y *Macp* se registraron en los estadios de trocófora y *veliger*, respectivamente. Cambios similares del perfil de expresión génica durante el desarrollo larvario fueron descritos anteriormente en ostra infectada con *Vibrio sp.* (Tirapé y col., 2007). La respuesta inmune de las larvas contra los patógenos depende de los hemocitos puesto que se

trata de células de mejillón inmuno-competentes capaces de reconocer partículas no propias (Glinski y Jarosz, 1997; Hine, 1999). Los valores de expresión más elevados para los genes *ApelB* y *Macp*, se detectaron en el estadio de trocófora (20 horas) sugiriendo que los hemocitos se generan relativamente rápido una vez tiene lugar la fertilización. La aparición temprana de los hemocitos durante el desarrollo se ha descrito en diferentes bivalvos (Elston, 1980; Tirapé y col., 2007). Estos resultados sugieren que sería necesario llevar a cabo experimentos adicionales que servirían para analizar si la hematopoyesis está activa tras una infección bacteriana, aumentando así el número de hemocitos y reforzando la respuesta inmune.

El análisis de expresión de estos genes en tejidos infectados, reveló algo inesperado. Dado que los hemocitos y las branquias son los principales tejidos implicados en la respuesta inmune, cabría pensar en una variación de los niveles de expresión de los genes en estos tejidos. Sin embargo, la infección bacteriana de mejillones adultos, también indujo cambios de expresión en el pie. De manera interesante, *ApelB* y *Macp* mostraron una cinética opuesta, de tal modo que, cuando se elevó la expresión de *Macp*, disminuyó la de *ApelB*. A pesar de que se podría sugerir un papel regulador de la proteína *ApelB*, no existen indicios o publicaciones que describan esa situación en otros modelos animales. Huang y col. (2007) también mostraron un incremento de expresión de 3.500 respecto al control, de la apextrina en la branquia de *Amphioxus* tras una infección con *V. parahaemolyticus*, sugiriendo una posible implicación de este gen en el sistema inmune temprano. En humanos, las proteínas MACPF desempeñan un papel en la protección contra cepas patogénicas bacterianas, víricas, micobacterianas, parasitarias y también de aquellas producidas por levaduras y protozoos (Van den Broek y Hengartner, 2000; Sodetz y Plumb, 2001; Trapani y Smyth, 2002; Gilbert, 2010). El alto nivel de expresión del gen *Macp* registrado en mejillones infectados, se correspondió a los resultados observados previamente por He y col. (2011) quienes describieron una regulación positiva del gen *Cg-Mpeg1* en *C. gigas* infectada con *V. parahemolyticus*.

La estimulación con LPS y LTA, compuestos que imitan infecciones de tipo bacteriano, indujo un aumento en la expresión de los genes *ApelB*, *ApelP* y *Macp*. Este hecho confirma que las proteínas MACPF (tipo apextrina y *Macp*) son capaces de penetrar en las paredes celulares y eliminar las bacterias (Sodetz y Plumb, 2001). La infección viral (representada por un tratamiento con poly I:C) también moduló el perfil de expresión de los genes. El gen *Macp* estuvo también regulado a pesar de que los

valores de expresión fueron más bajos que los valores obtenidos después de los tratamientos bacterianos. Renault y col. (2011) describieron recientemente el aumento de expresión del gen Cg-Mpeg1 tras una infección viral en ostra (*C. gigas*) infectada con herpesvirus. El tratamiento con zimosán (que imitaría una infección fúngica) indujo una cinética de expresión similar a la obtenida tras los tratamientos bacterianos a pesar de que los niveles de expresión de ApelB y ApelP alcanzaron niveles más altos. La modulación de la expresión de ApelB, ApelP y Macp en hemocitos tras una estimulación con PAMPs apoya la idea de una posible función inmune para estos genes.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE CASPASAS EN MEJILLÓN FRENTE A DIVERSOS ESTÍMULOS

II.1 INTRODUCCIÓN

La apoptosis es un proceso biológico esencial tanto en vertebrados como invertebrados si bien, la complejidad y función fisiológica de este mecanismo posee variaciones taxon-dependiente de carácter considerable (Kerr y col., 1972; Koyama y col., 2003; DeLeo, 2004). El proceso apoptótico es de vital importancia para muchos aspectos del desarrollo animal y juega un papel clave como mecanismo de defensa del hospedador contra patógenos virales y bacterianos además de velar por el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune (Tittel y Steller, 2000; Lamkanfi y col., 2002). La muerte celular programada con todas las características típicas de la apoptosis, ha sido descrita en algunas especies de moluscos bivalvos (Lacoste y col., 2001a, 2001b; Sunila y Labanca, 2003; Sokolova y col., 2004; Kefaloyianni y col., 2005; Huang y col., 2010; Châtel y col., 2011). La apoptosis en moluscos está implicada en el proceso de desarrollo larvario (Gifondorwa y Leise, 2006) y parece constituir una importante respuesta inmune que se activa a través de diferentes inductores (Terahara y Takahashi, 2008; Sokolova, 2009). Sin embargo, la información disponible sobre los genes que median este mecanismo y su regulación bajo diferentes estímulos, es limitada. En este sentido, es necesario centrar la atención en las proteínas denominadas caspasa, las cuales constituyen el núcleo de la maquinaria apoptótica y cuyo papel es indispensable para promover los mecanismos intracelulares que conllevan a la muerte programada en el reino animal (Stennicke y Salvesen, 1999).

El término caspasas se deriva de "cysteine-dependent aspartate-specific proteases" (*caspases* en inglés). Las caspasas pertenecen a una familia altamente conservada de cistein proteasas que comparten una rigurosa especificidad para romper aquellos residuos de ácido aspártico situados en sus sustratos. Esta especificidad permite a las caspasas desencadenar eventos proteolíticos selectivos en el citosol de las células animales (Alnemri y col., 1996; Budihardjo y col., 1999; Earnshaw y col., 1999).

Las caspasas se sintetizan como zimógenos activos, denominados pro-caspasas, que poseen una única cadena polipeptídica, de peso molecular situado entre los 32 y 55 kilodaltons (kDa). Las caspasas poseen tres dominios en común (Figura 1):

-
- a) Dominio central interno de gran peso molecular (17-21kDa) también denominado p20 que contiene una subunidad catalítica grande o sitio pentapéptido catalítico activo altamente conservado cuya estructura es QACXG, donde X: R, Q o G. El residuo de cisteína actúa como nucleófilo del sitio catalítico
 - b) Dominio C-terminal (10-13kDa), también denominado p10 o subunidad catalítica pequeña
 - c) Prodominio NH₂ terminal (3-24kDa) denominado dominio de muerte (DD), perteneciente a la familia de receptores TNF (Earnshaw y col., 1999). El DD posee a su vez dos subdominios: el dominio efector de muerte (DED) y el dominio de reclutamiento de la caspasa (CARD)



Figura 1. Estructura de las caspasas

En algunas pro-caspasas las subunidades p20 y p10 están separadas por una pequeña secuencia de unión. Los pro-dominios largos N-terminal de las pro-caspasas contienen motivos estructurales largos con un número de residuos que puede abarcar desde los 80 a los 100, denominados superfamilia del dominio de muerte y que están implicados en la transducción de la señal apoptótica (Weber y Vincenz, 2001). Tras la maduración, las pro-caspasas son procesadas proteolíticamente entre la subunidad grande y pequeña dando lugar a dos subunidades separadas de pequeño y gran tamaño. La caspasa activa pasaría a estar formada por un heterotetrámero constituido por dos subunidades pequeñas y dos grandes. La activación de las caspasas representa un punto de control principal en la apoptosis.

La nomenclatura de las caspasas se basa en el orden de su publicación. Así el primer miembro identificado perteneciente a esta familia de proteínas fue una proteasa responsable de la maduración proteolítica de la pro-IL-1 β o ICE (Interleukin-1 β -Converting Enzyme) (Black y col., 1989; Kostura y col., 1989) y posteriormente fue purificada y clonada como caspasa 1. Tal y como el nombre indica, la ICE/caspasa 1 es una enzima que procesa proteolíticamente al precursor interleuquina 1 β para generar una interleuquina 1 β activa (Cerretti y col., 1992; Thornberry y col., 1992). El

descubrimiento inicial de ICE no aportó ninguna evidencia sobre el papel de las proteasas tipo ICE en la muerte celular. Sin embargo, fue posteriormente, con la clonación del gen CED-3 del nematodo *C. elegans* que se tuvo constancia de que las proteasas tipo CED-3/ICE jugaban papeles clave en la ejecución de la apoptosis (Yuan y col., 1993).

Las caspasas poseen dos funciones principales: por una parte son las responsables de la transducción de la señal de muerte y rotura de muchas proteínas celulares que resultan en la activación y/o inactivación de otras y, en segundo lugar, son las encargadas de desencadenar muchos de los cambios bioquímicos y morfológicos asociados al proceso apoptótico (Hale y col., 1996). La existencia de fenotipos mutantes en mamíferos e invertebrados modelo, como la mosca, sugiere que las caspasas podrían también estar implicadas en procesos no relacionados con la apoptosis, como la proliferación y diferenciación celular (Chun y col., 2002; Lamkanfi y col., 2006), la motilidad celular (Chowdhury y col., 2008) o la función inmune (Nadiri y col., 2006); sin embargo, el papel funcional de algunas de estas proteínas es todavía desconocido (Vernooy y col., 2000).

Existen varias clasificaciones de las caspasas atendiendo a varios criterios. En base a la localización que poseen dentro de la cascada o corriente del proceso apoptótico (Riedl y Shi, 2004), se denominan caspasas iniciadoras o apicales aquellas que inician el proceso de muerte celular y activan las caspasas efectoras, ya sea directamente a través de proteólisis o indirectamente mediante mecanismos de señalización (Raff, 1998; Shi, 2004). Las caspasas efectoras o ejecutoras rompen posteriormente proteínas específicas que conllevan a la muerte celular (Enari y col., 1998).

Las caspasas iniciadoras o apicales están formadas por las pro-caspasas 2, 8, 9 y 10 mientras que el grupo de las ejecutoras lo constituyen las pro-caspasas 3, 6 y 7. Existen diferencias estructurales entre un grupo y otro de caspasas. Las caspasas apicales tienen largos pro-dominios que contienen motivos específicos como los dominios efectores de muerte o DEDs, como es el caso de las pro-caspasas 8 y 10; o también los dominios de reclutamiento de caspasas o CARDs, como ocurre con las pro-caspasas 2 y 9. Estos dominios median la transducción de la señal y la activación de las caspasas mediante procesos de oligomerización. Se activan en complejos de señalización inducida de muerte y también en respuesta a la ligación de los receptores

de muerte a la superficie de la célula (mecanismo extrínseco) o en respuesta a señales procedentes del interior de la célula (mecanismo intrínseco). Las caspasas se activan a través de dos roturas proteolíticas sucesivas. La primera ocurre entre la subunidad grande y pequeña (por el péptido de unión) y la segunda rotura se da entre el prodominio y la subunidad grande. Una vez activadas, las caspasas iniciadoras rompen y activan a las caspasas ejecutoras caracterizadas por la presencia de prodominios cortos (Boatright y Salvesen, 2003). La función de los prodominios largos de las caspasas iniciadoras es la de actuar como módulos de interacción mientras que los prodominios N-terminal cortos de las caspasas efectoras no tienen una función aparente.

Las proteínas caspasa poseen cuatro sitios o bolsillos diferentes denominados S1, S2, S3 y S4, que están implicados en el reconocimiento de una estructura central tetrapéptida (P4-P3-P2-P1), el sustrato y su catálisis. En base a la afinidad que las caspasas presentan por el sustrato, se pueden clasificar en tres grupos: grupo I, grupo II y grupo III. Así, el grupo I formado por las caspasas 1, 4, 5 y 13, tolera sustituciones en la posición aminoacídica P4 pero prefiere aminoácidos hidrofóbicos como la tirosina (Tyr) o el triptófano (Trp). En el grupo II, (caspasas 8, 9 y 10) existe una preferencia por ramas de cadenas alifáticas de aminoácidos en el P4. La especificidad de la rotura de la caspasa puede ser descrita como X-Glu-X-Asp. Las caspasas 1, 4 y 5 prefieren la secuencia de tetrapéptidos WEHD. Las caspasas 2, 3 y 7 muestran preferencia por el sustrato DEXD, donde las caspasas 6, 8 y 9 prefieren la secuencia (L/V) EXD. El grupo III, constituido por las caspasas 3 y 7, es más estricto en el "bolsillo" S4 necesitando un P4 de carácter aspártico. Existen trabajos que confirman la presencia de un gran número de proteasas tipo caspasa, en especies de vertebrados distintas de mamíferos e invertebrados, con actividad catalítica específica del aspartato y cuya estructura terciaria posee una homología similar a la estructura de las caspasas implicadas en la muerte celular.

Tras el primer aislamiento del CED-3 en *C. elegans*, han sido numerosas las caspasas que han sido descritas en vertebrados y en muchos phyla de invertebrados; desde cnidarios hasta equinodermos pero los mayores avances han tenido lugar en el estudio de invertebrados modelo, es decir, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (DeLeo, 2004; Cooper y col., 2009). Hoy en día, una búsqueda en Pubmed de la palabra caspasa revela que existen más de 55.300 publicaciones relacionadas con estas proteínas. Se sabe que la función fisiológica de muchas caspasas está

conservada a lo largo de las especies. Se han descrito genes con funciones similares a las caspasas en plantas y protistas poniendo en evidencia el reciente descubrimiento de las denominadas paracaspasas y metacaspasas (Chowdhury y col., 2008). Se trata de dos clases de genes que poseen similitud secuencial a las caspasas de metazoos. Mientras que en eucariotas, las paracaspasas están limitadas a los genomas del reino animal, las metacaspasas están presentes en protozoos, hongos, plantas y cromistas. En procariotas las proteínas tipo meta/paracaspasa se encuentran tanto en Archaea como Eubacteria.

En invertebrados se han identificado diversos genes homólogos a las caspasas de vertebrados superiores. Wiens y col. (2003) descubrieron un ADN complementario que codificaba para proteínas similares a la caspasa 3 de metazoos en la esponja *Geodia cydonium*, especie que representa al phylum de metazoos más ancestral. Se ha sugerido que las caspasas, junto con otros genes apoptóticos, aparecieron en poríferos y aumentaron en complejidad desde gusanos hasta mamíferos. Sin embargo, análisis recientes de secuencias completas de cnidarios sugieren que las caspasas eran ya altamente complejas en estos organismos y que muchos de esos genes apoptóticos se perdieron en organismos ecdisozoos como *C. elegans* y *Drosophila*. La disponibilidad de genomas secuenciados recientemente como el de la anémona *Nematostella vectensis* (Sullivan y col., 2006), un cnidario que se encuentra fuera del grupo de los organismos bilaterales, permite comprobar qué partes del proceso apoptótico han aparecido antes de la llegada de los bilaterales. En trabajos desarrollados en equinodermos se ha constatado que las caspasas y los dominios de muerte han aumentando en este grupo taxonómico al igual que en vertebrados, respecto de los invertebrados modelo clásicos (Robertson y col., 2006). Mientras que en erizo (*Strongylocentrotus purpuratus*) se han identificado al menos 31 secuencias distintas de genes con dominios caspasa pertenecientes a cinco subfamilias distintas (tipo caspasa 9, tipo caspasa 3/6/7, tipo caspasa 8, tipo ICE y caspasas N), en *Drosophila* solamente se han descrito 7 caspasas diferentes, de las cuales sólo 4 (DCP-1, DRONC, DRICE y DREDD) participan en muerte celular programada. Las caspasas de erizo se han agrupado en cinco subfamilias distintas. Una expansión análoga de los genes caspasa fue descrita previamente para los urocordados *Ciona intestinalis* y *Ciona savignyi* en los que se han descrito un total de 17 y 22 caspasas, respectivamente (Weill y col., 2005). Los urocordados al igual que los equinodermos son animales que se desarrollan de manera indirecta pasando por un estadio de larva planctónica, y es

posible que las expansiones de los genes caspasa en estos clados sean adaptaciones que facilitaron la remodelación del desarrollo que ocurre durante la metamorfosis adulta (Weill y col., 2005; Robertson y col., 2006). Robertson y colaboradores (2006) sugirieron que durante el proceso evolutivo de los organismos bilaterales tuvo lugar una expansión en el proceso apoptótico de los metazoos básicos por el cual éste se diversificó en el grupo de los deuteróstomos y dio lugar a los equinodermos y cordados y, se cortó en protóstomos afectando a artrópodos y nematodos.

Entre los vertebrados, se han identificado caspasas en anfibios, aves y peces (Yaoita y Nakajima, 1997; Inohara y Núñez, 2000; Nakajima y col., 2000). En estos últimos, se han identificado homólogos de todas las caspasas de mamíferos. Por ejemplo, en la dorada *Sparus aurata* se ha clonado un gen similar a la caspasa 1 (López-Castejón y col., 2008). La caspasa de vertebrado más primitiva ha correspondido a una caspasa ejecutora 3/7 (AmphiCASP-3/7) y ha sido identificada en el cefalocordado *Branchiostoma floridae*. En mamíferos han sido reconocidos 15 miembros distintos de la familia caspasa.

En moluscos tan sólo se ha descrito un gen tipo caspasa 8 en el gasterópodo *Haliotis diversicolor* (Huang y col., 2010) pero no existen descripciones de genes caspasa en otros grupos de moluscos (cefalópodos o bivalvos). Los moluscos bivalvos están altamente influenciados por el ambiente que les rodea. Su naturaleza sedentaria y hábitos filtradores hacen que sean susceptibles de acumular una gran cantidad de organismos comensales, oportunistas y patógenos compuestos por endoparásitos, protozoos, virus o bacterias así como sustancias tóxicas. Se ha comprobado que el mejillón es capaz de tolerar cantidades significativas de varias especies bacterianas pertenecientes al género *Vibrio* como *Vibrio alginolyticus* o *Vibrio parahaemolyticus* (Lhafi y Kühne, 2007). Asimismo, constituyen una herramienta de gran valor como bioindicadores en estudios de ecotoxicología (Farris y Van Hassel, 2006; Zorita y col., 2007). En la última década, los ecosistemas costeros han estado sujetos a un aumento de la contaminación por hidrocarburos como los PAHs o hidrocarburos aromáticos policíclicos. Éstos constituyen los componentes principales del crudo y derivados de la combustión de los combustibles fósiles. Se trata de moléculas lipofílicas que se metabolizan mediante la familia citocromo monoxigenasa P450 (CYP1) a metabolitos altamente reactivos que inducen la formación de aductos de ADN (Pelkonen y Nebert, 1982) y que se acumulan en los tejidos de los organismos marinos a altas concentraciones. Muchos de estos contaminantes son cancerígenos y mutagénicos y,

tanto en humanos como en roedores, se ha visto que poseen efectos inmunosupresores. Entre los PAHs se encuentran el benzopireno y el fenantreno. El benzopireno, es un PAH carcinógeno y un tóxico indirecto que es degradado a metabolitos solubles altamente tóxicos (Gómez-Mendikute y Cajaraville, 2003). Wootton y col. (2003) comprobaron que una concentración elevada de fenantreno producía tasas de mortalidad elevadas en organismos bivalvos como el berberecho (*Cerastoderma edule*) y la navaja (*Ensis siliqua*) mientras que el mejillón (*Mytilus edulis*) era capaz de sobrevivir. El bajo peso molecular del fenantreno da lugar a que sea un hidrocarburo altamente soluble en agua, fácilmente biodisponible y por ello altamente tóxico para los animales marinos (Neff y Anderson, 1981). Por otra parte, los bifenilos policlorinados (PCBs) pertenecen a un grupo de agentes químicos persistentes conocidos como hidrocarburos aromáticos halogenados. A pesar de que la producción comercial de estos compuestos se prohibió a finales de los años 70, los PCBs continúan suponiendo un problema para la salud dada su naturaleza lipofílica, su persistencia en el ambiente y sus efectos tóxicos demostrados. Se ha visto que los PCBs causan pérdida de la viabilidad celular y aceleran la muerte celular programada en varios modelos celulares tales como células neuronales, células renales, esplenocitos, células endoteliales vasculares y células monocíticas humanas (Yoo y col., 1997; Shin y col., 2000; Slim y col., 2000; Hwang y col., 2001; Pérez-Reyes y col., 2001; Mariussen y col., 2002; Sánchez-Alonso y col., 2003). Dado que estos organismos son altamente sensibles a los cambios climáticos, contaminantes y patógenos, cabría pensar en la existencia de un proceso apoptótico activo que asegurase la homeostasis del cuerpo de estos individuos.

En el presente capítulo se investiga la existencia de los genes caspasa presentes en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, y se completa la ruta de caspasas en esta especie. Se caracterizan un número de seis nuevas caspasas, iniciadoras y ejecutoras y, se analiza su regulación en respuesta a sustancias genotóxicas como es el caso de la luz ultravioleta, varios patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y contaminantes ambientales.

II.2 MATERIAL Y MÉTODOS

II.2.1 OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES DE ESTUDIO

Los ejemplares de mejillón pertenecientes a la especie *Mytilus galloprovincialis* fueron adquiridos en una planta comercial de depuración de marisco situada en la Ría de Vigo. Posteriormente, los animales se trasladaron a las instalaciones de aclimatación donde se mantuvieron durante una semana en tanques con agua de mar filtrada a una temperatura de 15°C y aireación. Los animales se alimentaron diariamente con una dieta a base de tres especies de microalgas, concretamente: *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* y *Skeletonema costatum*.

II.2.2 OBTENCIÓN DE SECUENCIAS COMPLETAS DE CASPASA MEDIANTE LA TÉCNICA RACE

A partir de dos librerías de ADN complementario (ADNc), previamente construidas para *M. galloprovincialis*, se seleccionaron seis secuencias parciales y diferentes entre sí con alta homología a caspasas. Para la amplificación de los extremos 5' y 3' de las secuencias seleccionadas se utilizó el kit de amplificación BD SMART RACE cDNA (BD Bioscience Clontech). Se procedió al aislamiento del ARN total de los hemocitos utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen), mediante una separación acuosa-orgánica siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Después, el ARN fue resuspendido en agua tratada con DEPC y se almacenó a una temperatura de -80°C. La calidad total del ARN fue analizada mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. Se sintetizaron los extremos de ADNc RACE 3' y 5' a partir de 1µg de ARN total utilizando la enzima BD PowerScript Reverse Transcriptase a una temperatura de 42°C y un tiempo de 90 minutos. Los cebadores empleados fueron 3'-CDS- A y 5'-CDS. Asimismo se utilizó el oligonucleótido Smart A II, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias de los extremos 3' y 5' de las diferentes caspasas se obtuvieron mediante PCR empleando el cebador Universal A mix y cebadores específicos diseñados con el software Primer3 (v.0.4.0) (Tabla 1). Las reacciones de PCR se sometieron a un ciclo estándar que consistió en 25 ciclos, a una temperatura de 94°C y un tiempo de 30 segundos, seguido de: 68°C durante 30 segundos, 72°C durante 3 minutos y por último, 72°C durante 7 minutos. Los

productos obtenidos fueron analizados en geles de agarosa a una concentración de 1% y teñidos con bromuro de etidio. Para visualizar las bandas se empleó un GelDoc XR machine (Bio-Rad). Posteriormente, los productos obtenidos se ligaron en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) siguiendo el protocolo de clonación "TA cloning" y empleando la enzima ligasa (Invitrogen). Tras la ligación, los productos se transformaron en células competentes DH5 α ™ (Invitrogen) y se llevó a cabo la selección de colonias blancas/azules en placas que contenían X-gal. Mediante PCR y usando cebadores específicos del vector M13 (M13 forward y reverse), se confirmó la presencia del inserto en las bacterias seleccionadas. Las colonias positivas fueron secuenciadas usando los mismos cebadores.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
<i>Muscel_Casp-2_RACE3-2.1</i>	GTTTACCATATGACAGGTAGTAAGAAAGG
<i>Muscel_Casp-3/7-1_RACE5-4</i>	CAGGACAGTTCGTTGCATTGAAGTATTCC
<i>Muscel_Casp-3/7-2_RACE5-1</i>	CCATAGCATCTGCCTGGTCTGGATCTC
<i>Muscel_Casp-3/7-2_RACE3-1</i>	TTCAGGCCTGTAGAGGAGGAGGATTAGG
<i>Muscel_Casp-3/7-3_RACE5-1</i>	TCCCCAGGCCTGTCTTTGTAACCAG
<i>Muscel_Casp-3/7-3_RACE3-1</i>	CCAGGTGGTGTGATGATGATGAGGA
<i>Muscel_Casp-3/7-3_RACE3-2</i>	CACGATTGTACGGGGCATTCTCTCC
<i>Muscel_Casp-3/7-4_RACE3-3</i>	TACGGGGCATTCTCTCTGGCTGTT

Tabla 1. Secuencias de cebadores usados para la amplificación RACE

II.2.3 CARACTERIZACIÓN DE SECUENCIAS DE CASPASA

Con el fin de obtener el alineamiento consenso de las secuencias de nucleótidos, se emplearon los programas bioinformáticos ChromasPro (v.1.33) y CAP3. En el caso de las secuencias aminoácidas se utilizaron diferentes herramientas del servidor Expasy Proteomics. Las secuencias consenso se compararon con aquellas

disponibles en la base de datos GenBank utilizando el programa ClustalW2. Asimismo, el programa pTARGET se usó para predecir la topología de las proteínas de caspasa. Las predicciones de péptidos señal, sitios de rotura y regiones transmembrana de las diferentes secuencias se llevaron a cabo utilizando los programas SignalIP 3.0, SOSUI y SMART, respectivamente. La base de datos PROSITE aportó información sobre los dominios de las proteínas, las familias y los sitios funcionales.

II.2.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas se llevó a cabo mediante la construcción de árboles filogenéticos. Para ello, se consideraron, por una parte, las seis secuencias completas homólogas a caspasa que fueron previamente descritas y 63 caspasas adicionales pertenecientes a diferentes organismos obtenidas de la base de datos GenBank. En primer lugar, se realizó un alineamiento de todas las secuencias proteicas mediante el programa ClustalW2. El algoritmo Neighbor-joining (NJ) se empleó para obtener dos árboles filogenéticos cuya estimación se llevó a cabo mediante el programa MEGA 3. El soporte nodal se estableció a través del mismo programa utilizado en el paso anterior y la confianza estadística de las relaciones filogenéticas se obtuvo mediante un número de 10.000 réplicas *bootstrap*.

II.2.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN TEJIDOS

El análisis de expresión de las seis caspasas se realizó en diferentes tejidos mediante PCR cuantitativa. Se emplearon nueve mejillones para extraer los siguientes órganos: pie, branquias, glándula, gónada femenina, gónada masculina, hemocitos, manto, músculo y palpo. El ARN total se aisló utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) y siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. En cada muestra se mezcló el ARN del mismo tejido de tres individuos. Se sintetizó el ADNc con la enzima SuperScript III (Invitrogen) usando para ello 1µg de ARN total, tratado con Turbo ADN-free (Ambión) para eliminar cualquier tipo de ADN que pudiese estar contaminado. Se diseñaron cebadores específicos con el programa Primer 3 (v. 0.4.0) y se comprobaron los niveles de eficiencia en la reacción de amplificación de acuerdo con el protocolo descrito por Livak y Schmittgen (2001) (Tabla 2). Un total de 0,5µl de cada cebador (10µM) se mezcló con 10,5µl de SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) en un volumen final de 21µl. Las muestras se sometieron a las siguientes condiciones de amplificación: 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C

durante 15s y 60°C durante 1 minuto. El método Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ method) fue usado para determinar el nivel de expresión de los genes analizados (Livak y Schmittgen, 2001). La expresión de los genes caspasa fue estandarizada usando el gen actina como un gen control o *housekeeping*.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
<i>MusseL_Casp-2_qPCR-4F</i>	GATATATGACAAGGGTGGCAATG
<i>MusseL_Casp-2_qPCR-4R</i>	GACTTTACAGCATCCAGGACATC
<i>MusseL_Casp-3/7-1_qPCR-F</i>	GATCTTGGAAAGTGGTGTAGAACG
<i>MusseL_Casp-3/7-1_qPCR-R</i>	CACTGCTAGGAAATCTGCTTCAT
<i>MusseL_Casp-3/7-2_qPCR-3F</i>	CCTGTAGAGGAGGAGGATTAGGAC
<i>MusseL_Casp-3/7-2_qPCR-3R</i>	GGAAGGATCCATAACCAGCAG
<i>MusseL_Casp-3/7-3_qPCR-F</i>	CAATGTGTAAAAACGAGAGACATTG
<i>MusseL_Casp-3/7-3_qPCR-R</i>	GTTAGTATATGCCCACTGTCCATTC
<i>MusseL_Casp-3/7-4_qPCR-2F</i>	GATTTCTTGAAGTCTTTTCTACGTC
<i>MusseL_Casp-3/7-4_qPCR-2R</i>	AATATCATCGTCTTCTGGATGTTAT
<i>MusseL_Casp-8_qPCR-F</i>	CCCAACCAGTAGTAACACCAGAC
<i>MusseL_Casp-8_qPCR-R</i>	GTATGAACCATGCCCTATATCA
<i>MusseL_Actin_qPCR-F</i>	AACCGCCGCTTCTTCATCTTC
<i>MusseL_Actin_qPCR-R</i>	TACCACCAGACAAGACGG

Tabla 2. Secuencias de cebadores específicos usados en PCR cuantitativa

Las unidades de expresión se calcularon dividiendo los valores de expresión estandarizada en los diferentes tejidos, entre la expresión de los valores estandarizados obtenidos en el músculo. Los datos se analizaron usando el test-t de Student. Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar de tres muestras diferentes y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para un valor $p < 0,05$.

II.2.6 INDUCCIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE TRATAMIENTO CON LUZ ULTRAVIOLETA

En este experimento se emplearon nueve individuos adultos de mejillón a los cuales se les extrajo hemolinfa del músculo aductor con ayuda de una jeringuilla. Para facilitar la maniobra de extracción se agujereó con un esmeril la concha del animal en las proximidades del músculo y se procedió a extraer la sangre de cada uno de los individuos. El número de hemocitos obtenidos se ajustó con FSW a 2×10^6 células/ml. La hemolinfa se depositó en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos (Falcon). Tras 15 minutos de incubación a una temperatura de 15°C, el volumen total de cada pocillo se redujo a 500µl y las células fueron expuestas durante 45 minutos a luz ultravioleta (UV) emitida por una lámpara germicida (Sylvania G8T5 light bulb). Posteriormente, se reestableció el volumen de hemolinfa en cada pocillo mediante la adición de 1ml de FSW y las placas se incubaron nuevamente a 15°C. En todos los experimentos se incluyó un grupo control no expuesto a luz UV. Después de 0, 1, 3, 6 y 24 horas post-tratamiento, los hemocitos se recogieron y se procesaron con el fin de analizar diferentes aspectos del proceso apoptótico.

II.2.7 EVALUACIÓN DEL PROCESO APOPTÓTICO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA

Se evaluaron los cambios morfológicos inducidos en hemocitos tratados con luz UV mediante microscopía óptica (Nikon Eclipse 80i). Para ello, los hemocitos expuestos a la luz se despegaron del fondo de las placas con un *cell scraper* o rascador (Falcon) y se incluyeron en cubetas de citocentrífuga *Cytospin* (Cytospin 4, Thermo Scientific). Las muestras se fijaron a portaobjetos de cristal por centrifugación a 28xg, baja aceleración y durante un tiempo de 5 minutos. Las preparaciones se dejaron secar al aire durante otros 5 minutos y después se tiñeron con el kit de tinción Hemacolor (Merck). En todos los casos, el grupo control fue procesado siguiendo el mismo protocolo.

II.2.8 EVALUACIÓN DEL PROCESO APOPTÓTICO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se evaluaron los niveles de apoptosis en hemocitos de mejillón mediante la técnica de citometría de flujo. Los hemocitos tratados y no tratados con luz UV se

recogieron y se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1,5ml. Las muestras se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en Binding buffer a concentración 1X (10mM Hepes/NaOH, pH 7,4, 140mM NaCl, 2,5mM CaCl₂) el cual contenía 5µl de annexina V-FITC (BD Biosciences) y 10µl de 7-amino-actinomicina (7-AAD) (BD Biosciences). Las células se incubaron durante 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se cuantificó el porcentaje de células apoptóticas y/o necróticas con ayuda de un citómetro de flujo FACSCalibur y usando el software Cell Quest (BD Biosciences). Concretamente, la detección del contenido de annexina V-FITC y 7-AAD se hizo a través de los canales FL-1 (530nm) y FL-3 (>650 nm), respectivamente. Se calculó el porcentaje de hemocitos positivos detectados en el canal FL-1 y obtenidos después del tratamiento con UV, entre los valores registrados en el grupo control. Los datos se analizaron usando el test-t de Student. Los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar de las nueve muestras de hemocitos y las diferencias se consideraron significativas para $p < 0,05$.

II.2.9 MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS CASPASAS TRAS LA EXPOSICIÓN A LUZ ULTRAVIOLETA

Para determinar y cuantificar los patrones de expresión de los genes caspasa en hemocitos de mejillón, se llevó a cabo una PCR cuantitativa utilizando los ARNs de los hemocitos expuestos a la luz UV tal y como se describió en el apartado II.2.6. La amplificación se llevó a cabo usando los cebadores específicos diseñados previamente (Tabla 2) y las condiciones de PCR cuantitativa fueron similares a las que se detallan en el apartado II.2.5. Los niveles de expresión de los genes caspasa se normalizaron utilizando el gen actina como gen constitutivo. Las unidades de expresión se calcularon dividiendo los valores de expresión estandarizada en los hemocitos tratados con UV entre los valores de expresión estandarizada obtenidos en el grupo control no tratado. Los datos se analizaron usando el test-t de Student donde los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar de los tres pools (3 ARNs individuales por pool) y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

II.2.10 MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CASPASAS BAJO DIFERENTES ESTÍMULOS

II.2.10.1 ESTIMULACIÓN *IN VITRO* CON PAMPS

Varios PAMPs se añadieron a cultivos primarios de hemocitos. Concretamente, soluciones con 1 mg/ml de poly I:C, zimosán, lipopolisacárido (LPS) o ácido lipoteicoico (LTA) fueron preparadas a partir de un stock comercial (Sigma-Aldrich). También se utilizaron CPGs (ADN aislado de un cultivo de *Vibrio anguillarum*). Para su preparación, se hizo crecer la bacteria en un medio de TSA suplementado con un 1% de NaCl a temperatura ambiente. El ADN bacteriano se aisló usando fenol-cloroformo y la concentración de CpG se ajustó a 1mg/ml. Por otra parte, la hemolinfa de cinco mejillones adultos fue extraída tal y como se mencionó anteriormente. La hemolinfa se mezcló en cuatro pools de modo que cada pool estuvo formado por un volumen de 2,5ml de hemolinfa. Se incubaron los hemocitos (20 cultivos primarios) con las soluciones de PAMPs a una concentración final de 50µg/ml. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 15°C y se realizaron, al menos, dos réplicas. El análisis de expresión de los genes se evaluó a 0, 1, 3 y 6h post-estimulación mediante el uso de PCR cuantitativa.

II.2.10.2 ESTIMULACIÓN *IN VITRO* CON COMPUESTOS ORGANOCLORADOS

Para analizar el efecto de los contaminantes ambientales en el sistema inmune de mejillón, se expusieron cultivos primarios de hemocitos a diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y policlorobifenilos (PCBs) (Sigma-Aldrich). Se extrajo la hemolinfa de 12 mejillones del músculo aductor y se mezcló en 4 muestras de manera que cada una de ellas estuvo formada por hemolinfa de 3 individuos distintos. Las células se ajustaron a una concentración final de $2,5 \times 10^4$ células/ml con FSW y se depositaron en placas de cultivo de 24 pocillos (Falcon). Los hemocitos se incubaron con los PHAs; fenantreno y benzopireno, a una concentración final de 100ppb y con PCBs a 3,5 µg/ml. Los grupos control se trataron con el mismo volumen de FSW. La expresión de genes se analizó tras 1, 3 y 6h post-tratamiento a través de PCR cuantitativa.

II.3 RESULTADOS

II.3.1 CARACTERIZACIÓN DE SECUENCIAS DE CASPASA

Tras la amplificación RACE, clonación y secuenciación, se obtuvieron los ADNc correspondientes a los marcos abiertos de lectura (ORFs) de seis genes de mejillón homólogos a proteínas caspasa. Dos de las secuencias obtenidas se incluyeron en el grupo de las caspasas iniciadoras y se designaron caspasa 2 y caspasa 8 en base al grado de identidad y en comparación con las secuencias disponibles en las bases de datos públicas. La primera secuencia tuvo una longitud de 1.545 pares de bases (pb) y codificó para una proteína de 468 aminoácidos. La identidad entre esta secuencia y otras caspasas iniciadoras como la caspasa 2 de *Xenopus laevis* y la caspasa 9 de *Danio rerio* fue elevada; concretamente los E-values registrados fueron de $2e^{-216}$ y $2e^{-214}$, respectivamente. La segunda secuencia tuvo una longitud de 1.379 pb y codificó para una proteína más corta de 383 residuos. Fue considerada como una caspasa 8 dada su identidad con las caspasas 8 de *Oryzias latipes* y *Tubifex tubifex* (E-values de $1e^{-226}$ y $1e^{-224}$, respectivamente). Las cuatro secuencias restantes se incluyeron en el grupo de las caspasas ejecutoras y se designaron como caspasas 3/7-1, 3/7-2, 3/7-3 y 3/7-4 en base a la identidad con el grupo de caspasas 3/7. La longitud de las secuencias, el número de aminoácidos y los E-values obtenidos se recogen de manera detallada en la Tabla 3. Las identidades entre las caspasas ejecutoras fueron muy bajas. Concretamente, se situaron por debajo del 19% entre las formas 1 y 3, 2 y 3, 3 y 4; estuvieron alrededor del 50% entre 1 y 4, 2 y 4 y alcanzaron valores por encima del 60% entre la 1 y 2. Se usaron los programas ScanProsite y SMART para analizar estructuralmente las secuencias de caspasa traducidas y poder predecir la presencia de dominios conservados. Así, la caspasa 2 de mejillón presentó un prodominio largo N-terminal que contuvo un motivo CARD de estructura larga con 92 residuos. Sin embargo, esta caspasa no conservó la subunidad p20 a pesar de que el resto de caspasas sí lo contenían. Este hecho también se constató a través de varias amplificaciones RACE. Posteriormente, mediante la amplificación por PCR, clonación y secuenciación, se confirmó la estructura de la molécula. La subunidad pequeña p10 estuvo presente en todas las caspasas. En la caspasa 8 se encontró un único dominio DED con un valor de confianza muy bajo.

	Caspasa-3/7-1	Caspasa-3/7-2	Caspasa-3/7-3	Caspasa-3/7-4
Total pb	1079	1258	1340	1126
ORF	942	942	996	888
AA	313	313	331	295
Especies	Caspasa 3 <i>B. taurus</i>	Caspasa 7 <i>M. musculus</i>	Caspasa 3 <i>S. purpuratus</i>	Caspasa 3 <i>D. rerio</i>
	Caspasa 3 <i>C. clemensi</i>	Caspasa 3 <i>C. clemensi</i>	Caspasa 3/7 <i>B. floridae</i>	Caspasa 3 <i>O. latipes</i>
E-values	$6e^{-37}$	$4e^{-38}$	$4e^{-21}$	$6e^{-32}$
	$7e^{-37}$	$5e^{-38}$	$2e^{-19}$	$1e^{-31}$

Tabla 3. Características de las caspasas incluidas en el grupo de las caspasas ejecutoras

En la Figura 1A se indican las caspasas iniciadoras y ejecutoras como A y B, respectivamente. La estructura de las caspasas ejecutoras en mejillón fue similar a la estructura de las caspasas 1, 3 y 7 descritas en insectos (Figura 1B). Se empleó el programa ScanProsite para comprobar la presencia de dominios conservados en todas las proteínas caspasa, con la excepción del dominio DED presente en la caspasa 8 de mejillón, el cual fue detectado a través del programa SMART. Las subunidades grandes y pequeñas son el resultado de la rotura del proenzima por los residuos aspártico Asp (D), los cuales son homólogos a los aspárticos de humano Asp316 y Asp330 (basados en sitios equivalentes descritos en caspasa 2 de humano). Las proteínas caspasa poseen cuatro sitios diferentes o bolsillos (S1, S2, S3 y S4) implicados en el reconocimiento de un motivo central tetrapéptido (P4-P3-P2-P1), el sustrato y su catálisis. Se detectaron los residuos conservados presentes en los sitios S1, S2, S3 y S4. En el sitio S1, se localizaron la arginina Arg179 y glutamina Gln283, los cuales se conservaron en todas las caspasas excepto en la caspasa 2 donde el residuo de Gln283

fue sustituido. En los sitios S2 y S3 se localizaron la serina Ser339 y la arginina Arg341, respectivamente. La serina Ser339 se reemplazó en caspasa 2, caspasa 3/7-3 y caspasa 8, y la arginina Arg341 se sustituyó en caspasa 2 y caspasa 3/7-4.

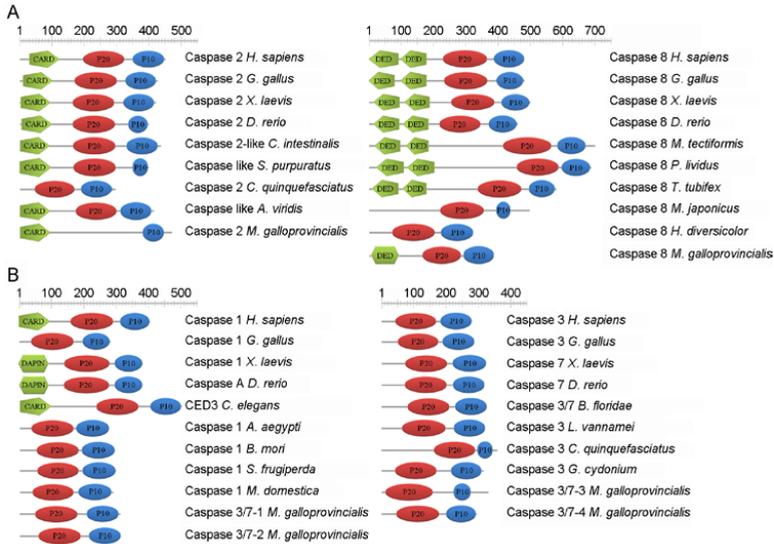


Figura 1. Arquitectura de dominios de las caspasas iniciadoras y ejecutoras. A y B se refieren a las caspasas iniciadoras y ejecutoras, respectivamente. Las características de dominios fueron predichas con el programa ScanProsite. El dominio DED de la caspasa 8 de mejillón se predijo mediante el programa SMART.

El sitio de unión S4, ha sido descrito por ser clave y determinante de la especificidad del sustrato. Presentó variaciones de manera considerable entre las diferentes caspasas. El triptófano Trp348 que ha sido descrito por determinar la forma física de la especificidad del bolsillo, sólo se conservó en la caspasa 3/7-3 y caspasa 8. La prolina reemplazó al triptófano Trp348 en las caspasas 3/7-1, 3/7-2 y 3/7-4 y la alanina Ala reemplazó al triptófano en la caspasa 2. La prolina al igual que el triptófano, es un residuo aminoácido hidrofóbico. El sitio activo de estructura QACRG, estuvo presente en todas las caspasas a excepción de la caspasa 2.

En una caspasa típica, tras la unión al sustrato, el proceso de catálisis implica a un diado catalítico compuesto por los residuos cisteína Cys285 e histidina His237, además de un agujero oxianión que a su vez hace que participen la glicina Gly238 y cisteína Cys285 (todos los residuos se conservaron en mejillón excepto en caspasa 2) (Figura 2).

II.3.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las caspasas iniciadoras se dividieron en dos grupos principales (Figura 3). La primera rama incluyó a las caspasas 2 y 9 mientras que la segunda incluyó a las caspasas 8 y 10. Las caspasas de vertebrados e invertebrados (2/-9) se separaron, mayoritariamente, en otros subgrupos adicionales. La caspasa 2 de mejillón se localizó en la rama principal de la caspasa 2/9 y cerca de las secuencias de invertebrados como cnidarios, nematodos, insectos y crustáceos. La caspasa 8 de mejillón se situó en la segunda rama principal (caspasas 8/10), lejos de los vertebrados pero más cerca de la caspasa descrita en oreja de mar (*Haliotis diversicolor*).

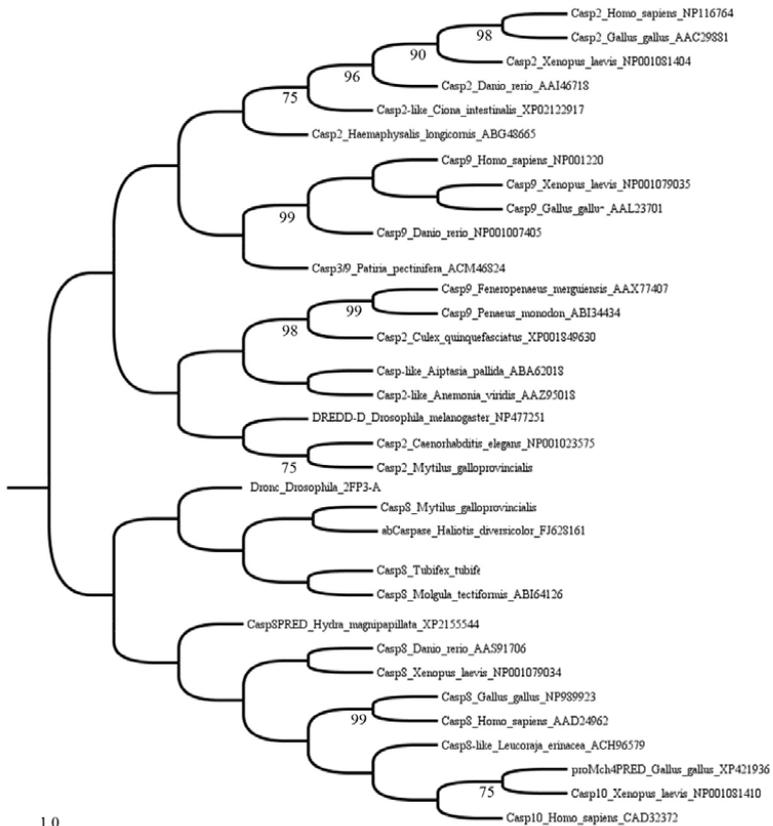


Figura 3. Análisis filogenético de caspasas iniciadoras. Árbol filogenético siguiendo el método Neighbor-joining (NJ) con 10.000 repeticiones *bootstrap*. Los números que están encima de las ramas son porcentajes *bootstrap*.

Las caspasas ejecutoras de mejillón fueron analizadas usando las secuencias disponibles de las caspasas 1, 3 y 7, en la base de datos GenBank (Figura 4). Las caspasas de vertebrados 3/7 y caspasa 1 se agruparon de manera diferente. Cabe destacar que la caspasa 1 de insectos se agrupó en la rama de las caspasas 3/7. Las cuatro caspasas de mejillón 3/7 fueron localizadas en un pequeño grupo situado entre ambas ramas principales y en consecuencia, constituyeron un grupo intermedio entre la caspasa 1 de vertebrados y la rama de las caspasas 3/7.

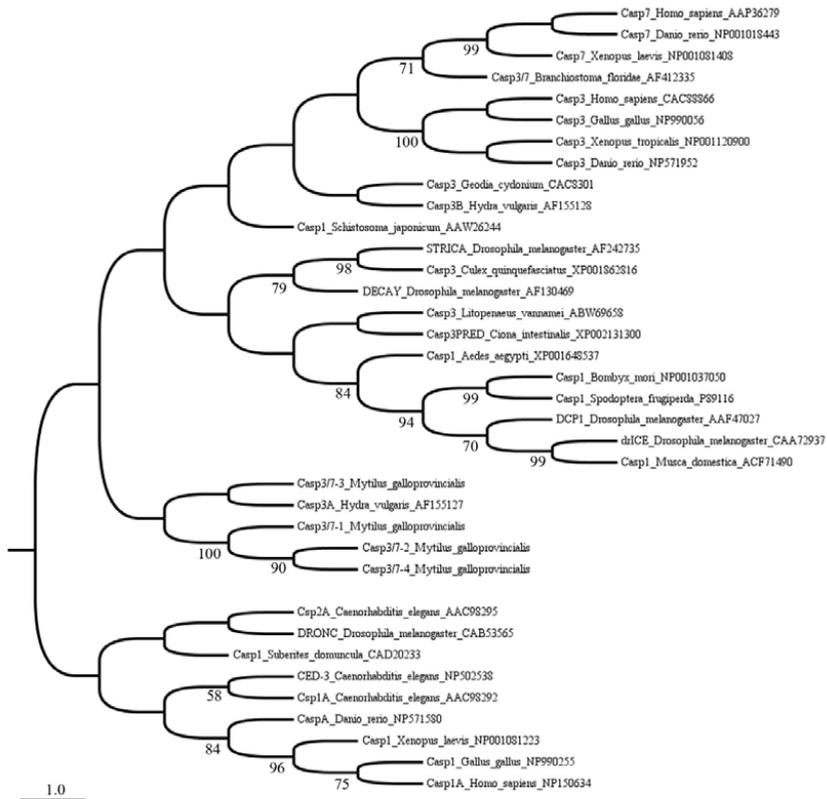


Figura 4. Análisis filogenético de caspasas ejecutoras. El árbol filogenético se construyó siguiendo el algoritmo Neighbor-joining (NJ). Los números que están sobre las ramas indican los porcentajes *bootstrap*.

II.3.3 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN EN TEJIDOS

El análisis de expresión de caspasas en diferentes tejidos reveló que el músculo fue el tejido que registró los valores de expresión más bajos en todos los genes, a excepción de las caspasas 2 y 3/7-2. Para estas caspasas, el valor de expresión más bajo correspondió a las gónadas masculina y femenina (Figura 5).

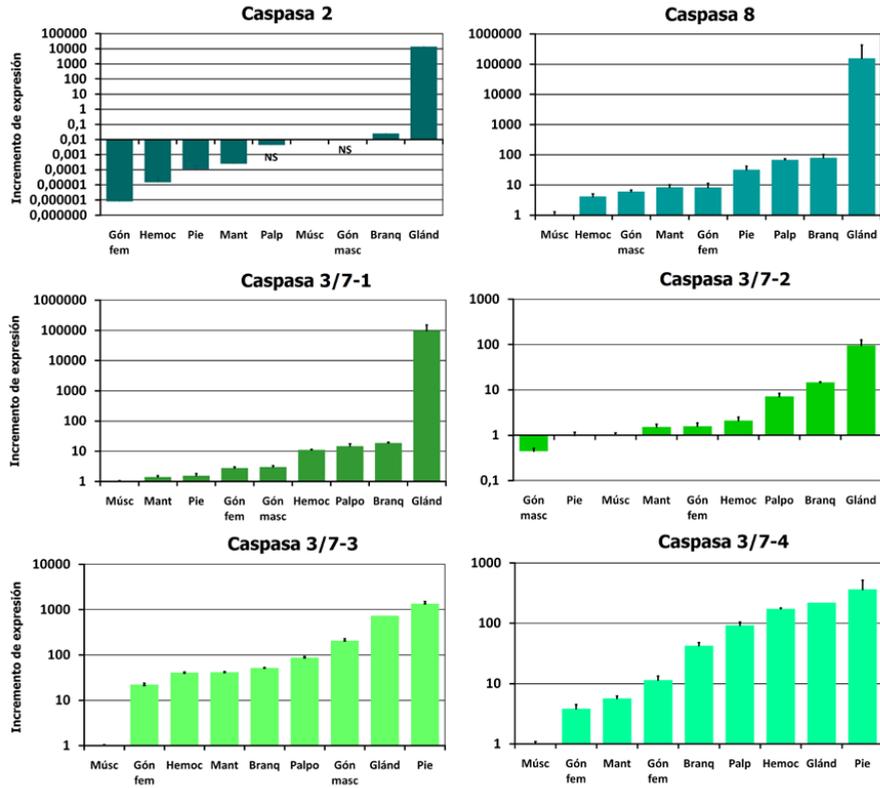


Figura 5. Expresión de los genes caspasa en diferentes tejidos. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de tres muestras diferentes. Las unidades de expresión se calcularon dividiendo los valores de expresión estandarizada en los diferentes tejidos por los valores de expresión estandarizada obtenidos en el músculo. Los datos fueron analizados usando el test-t de Student. NS indica la presencia de diferencias no significativas respecto a los niveles de expresión detectados en músculo.

En general, los valores de expresión más altos para todos los genes de caspasa se detectaron en glándula, variando desde las 95 veces por encima del músculo para caspasa 3/7-2, hasta las 106 veces para caspasa 2. Otros tejidos como branquia, pie,

palpo y hemocitos mostraron valores de expresión intermedia y el manto y gónadas registraron los valores de expresión más bajos. Los valores de expresión para todas las caspasas en los tejidos muestreados fueron significativamente diferentes respecto a los valores obtenidos en el músculo. Sólo los valores de expresión de la caspasa 2 detectados en palpo y la gónada masculina y los valores de expresión de caspasa 3/7-2 detectados en pie y manto no fueron significativamente diferentes a los valores de expresión obtenidos en el músculo.

II.3.4 INDUCCIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE TRATAMIENTO CON LUZ ULTRAVIOLETA

II.3.4.1 EVALUACIÓN DEL PROCESO APOPTÓTICO MEDIANTE MICROSCOPÍA ÓPTICA

Se observaron cambios histológicos, relacionados con el proceso apoptótico, en hemocitos tratados con luz ultravioleta (Figura 6). A lo largo del tiempo se fue observando un aumento secuencial en los cambios morfológicos. A las 3h post-tratamiento, se observó una ligera condensación de la cromatina.

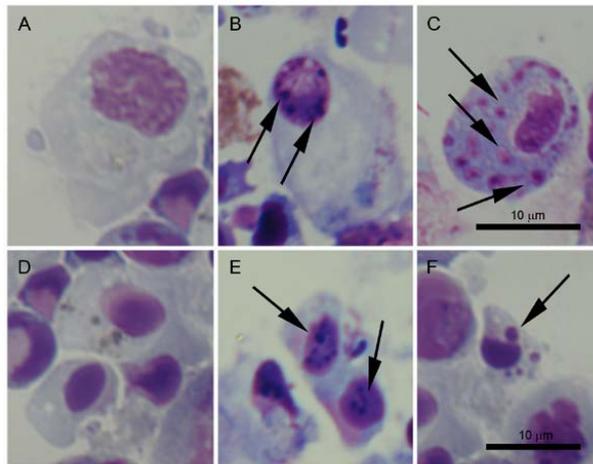


Figura 6. Cambios histológicos relacionados con el proceso apoptótico observado en hemocitos tratados con luz ultravioleta. **A y D:** Muestran los granulocitos control y los pequeños hialinocitos no tratados con luz ultravioleta. **B:** Ligera condensación de cromatina observada en granulocitos después de 3h post-tratamiento. **C y F:** Presencia de cuerpos apoptóticos dentro del citoplasma de granulocitos e hialinocitos, respectivamente, después de 24h post-tratamiento. **E:** Condensación de la cromatina en pequeños hialinocitos después de 6h.

Debido al pequeño tamaño de los hialinocitos, esta característica se observó de manera más clara en los granulocitos (Figura 6B). A las 0 y 1 horas post-tratamiento, no se observó ningún cambio morfológico (datos no mostrados), pero tras 6h, éstos se hicieron más evidentes y poco a poco se empezaron a visualizar muchas partículas densas dentro de los núcleos en ambos tipos de hemocitos (Figura 6E). Los cambios apoptóticos fueron muy claros después de 24 horas, cuando la vacuolización citoplasmática y los cuerpos intracelulares estuvieron presentes. Éstos últimos mostraron tinción del ADN y aparecieron como fragmentos nucleares dentro de las células apoptóticas (Figuras 6C y 6F). Ninguno de los cambios histológicos que se mencionan fueron detectados en los grupos control (Figuras 6A y 6D).

II.3.4.2 EVALUACIÓN DEL PROCESO APOPTÓTICO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

El grado de apoptosis en diferentes poblaciones de hemocitos fue analizado usando un citómetro de flujo y una metodología de doble tinción con los reactivos annexina V-FITC y 7AAD (Figura 7). Partiendo de diferentes plots de densidad, los hemocitos totales se agruparon en dos poblaciones principales: R1 y R2. La población R1 presentó los mayores valores de tamaño relativo (Forward scattered, FSC) y complejidad interna o granularidad (Side scattered, SSC). Asimismo, estuvo constituida principalmente por células granulares, mientras que la población R2, con valores más

bajos de FSC y SSC, estuvo formada por pequeños hialinocitos (Figura 7).

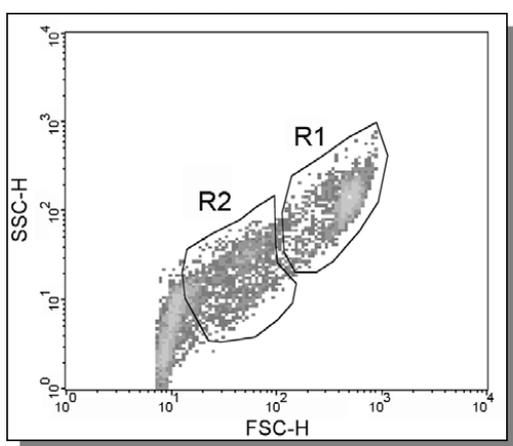


Figura 7. Evaluación de los niveles de apoptosis inducidos en hemocitos tratados con UV por citometría de flujo. Los hemocitos se dividen en dos poblaciones en base a sus características de FSC y SSC.

Un pequeño número de células R1 se tiñó con annexina V-FITC después de 0, 1 y 3h post-tratamiento con UV aunque el número de células positivas (annexina V+) fue

5 veces mayor en las células tratadas con UV que en los controles. Se observó un incremento en el número de células R1 positivas a lo largo del curso de tiempo así como un incremento significativo en el número de células positivas después de 24h post-tratamiento, en comparación con los resultados obtenidos al comienzo del experimento. En este punto de tiempo, el número de células positivas fue 23 veces más alto en células tratadas con UV que en el grupo control (Figura 8). La tendencia fue opuesta en el caso de las células incluidas en la región R2. Los valores positivos más altos fueron registrados a 0h post-tratamiento con un número de células positivas 16 veces mayor en células tratadas con UV que en los controles. El incremento de células positivas a 0h en esta región fue significativamente diferente de los valores obtenidos a 6h y 24h (Figura 8). En todas las poblaciones tratadas con UV, el porcentaje de células necróticas (7AAD+) fue más bajo que el 15% y no aumentó durante el curso de tiempo (datos no mostrados).

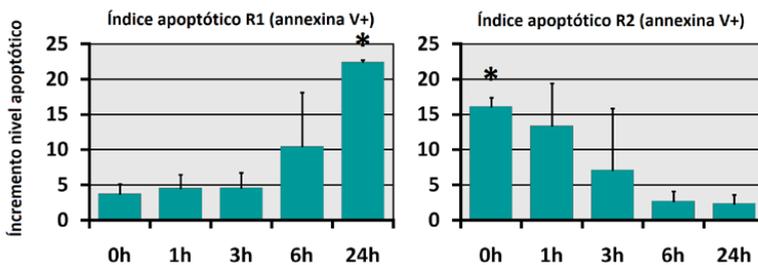


Figura 8. Cambios de los niveles apoptóticos durante el curso de tiempo en las poblaciones R1 y R2. Índice apoptótico de la población R1. Índice apoptótico de la población R2. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de los datos de 9 poblaciones de hemocitos. Los datos fueron analizados usando el test t de Student. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas para $p < 0,05$.

II.3.5 MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS CASPASAS TRAS LA EXPOSICIÓN A LUZ ULTRAVIOLETA

El tratamiento de hemocitos con UV indujo importantes cambios en los perfiles de expresión de las caspasas a lo largo del experimento. La caspasa 2 se reguló de manera negativa a 0h post-tratamiento (0,01 veces por debajo del control) y aumentó de manera significativa a las 3h y 6h post-tratamiento. Los niveles de expresión disminuyeron a las 24h y para ese intervalo de tiempo las condiciones registradas

fueron similares a las iniciales (Figura 9). La caspasa 8 mostró los valores de expresión más altos, alcanzando a las 6h un valor máximo de 75 veces por encima del control. La caspasa 8 registró niveles de expresión elevados a lo largo de todo el experimento, incluso los valores de expresión más bajos, que fueron aquellos registrados a 0h y 24h post-tratamiento, fue de 6 veces respecto al nivel control (Figura 9).

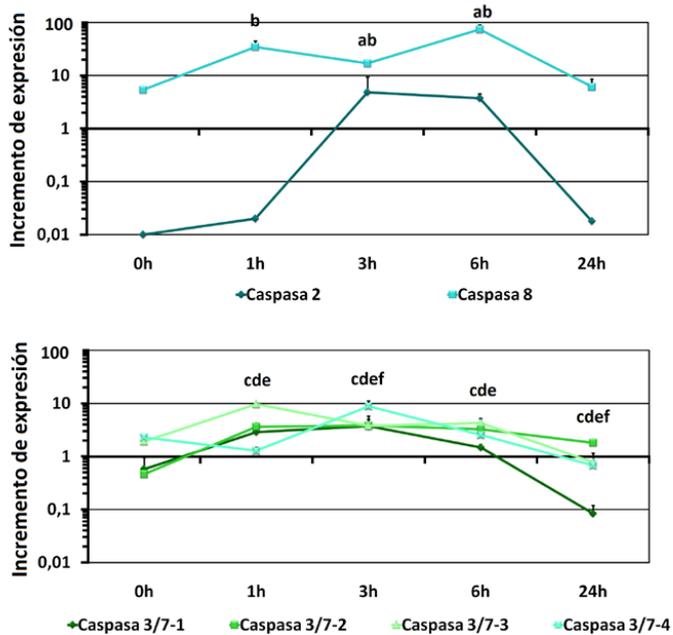


Figura 9. Cinética de la expresión de caspasas en hemocitos tratados con UV. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de 3 pooles (3 poblaciones de hemocitos por pool). Los datos fueron analizados usando el test- t de Student. Evolución de los niveles de expresión de las caspasas iniciadoras 2 y 8. a y b indican diferencias significativas en las caspasas 2 y 8, respectivamente. Evolución de los niveles de expresión de las caspasas ejecutoras 3/7-1, 3/7-2, 3/7-3 y 3/7-4. c, d, e y f indican diferencias significativas para $p < 0,05$ en las caspasas 3/7-1, 2, 3 y 4, respectivamente.

En lo que a las caspasas ejecutoras se refiere, las caspasas 3/7-1 y 3/7-2 mostraron cinéticas de expresión muy similares. A 0h post-tratamiento, ambas caspasas se regularon negativamente registrando valores en torno a 0,5 por debajo de los controles. A 1h, 3h y 6h post-tratamiento se registró un aumento significativo alcanzando los máximos niveles de expresión después de 3h (3,8 veces por encima de los controles para ambas caspasas). La caspasa 3/7-1 se reguló negativamente de manera significativa a las 24h (0,08 por debajo de los controles); mientras que, la

caspasa 3/7-2 mantuvo su regulación positiva durante todo el curso de tiempo y prolongándose hasta el final del experimento a las 24h post-tratamiento (Figura 9). La caspasa-3/7-3 se mantuvo expresada de manera positiva todo el tiempo. A 1h, 3h y 6h post-tratamiento se registraron los valores significativos más altos, sin embargo, el valor máximo de expresión fue obtenido a 1h post-tratamiento. La caspasa 3/7-4 solamente se reguló de manera positiva y significativa a las 3h post-tratamiento. Por último, la expresión disminuyó hasta registrar valores negativos significativos de expresión al final del experimento (Figura 9).

II.3.6 MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CASPASAS BAJO DIFERENTES ESTÍMULOS

II.3.6.1 ESTIMULACIÓN *IN VITRO* CON PAMPS

Para analizar la implicación de las caspasas en la respuesta inmune inducida por patógenos, los hemocitos de mejillón fueron tratados con varios PAMPs (Figura 10). Los PAMPs que representaron las diferentes infecciones bacterianas, es decir, el LPS, CPGs y LTA, fueron capaces de modular la expresión de los genes de estudio. El LPS y los CPGs indujeron alteraciones de la expresión cuyo valor estuvo por debajo de 3,5, respecto al control. Las caspasas iniciadoras 2 y 8 se regularon de manera negativa y significativa después de 3h, en todos los tratamientos. A las 6h post-tratamiento, el LPS y el LTA indujeron una regulación positiva y significativa de la caspasa 2, mientras que el tratamiento de los CPGs indujo una regulación similar en caspasa 8. Las caspasas ejecutoras 3/7-1 y 3/7-2 mostraron una cinética análoga para todos los tratamientos. El LPS y LTA indujeron un aumento de la expresión de ambas caspasas durante el experimento. La caspasa 3/7-2 alcanzó niveles significativamente diferentes respecto a los controles a partir de las 3h post-tratamiento. Por otra parte, la caspasa 3/7-1 no se reguló de manera positiva significativa a las 3h en muestras tratadas con LTA. Durante el tratamiento con CPGs (Figura 10), los niveles de expresión de las caspasas 3/7-1 y 3/7-2 alcanzaron el pico más alto después de 3h post-tratamiento seguido de una disminución significativa de la expresión tras las 6h.

Las caspasas 3/7-3 y 3/7-4 se vieron menos afectadas por los tratamientos durante el curso de tiempo. Así, la caspasa-3/7-3 se reguló de manera negativa y significativa después de 3h post-tratamiento para todos los PAMPs, recuperando los valores de expresión inicial a las 6h post-tratamiento en LPS y LTA o alcanzando los

valores máximos con el tratamiento de CPGs. No se registraron cambios significativos en los valores de expresión de la caspasa 3/7-4.

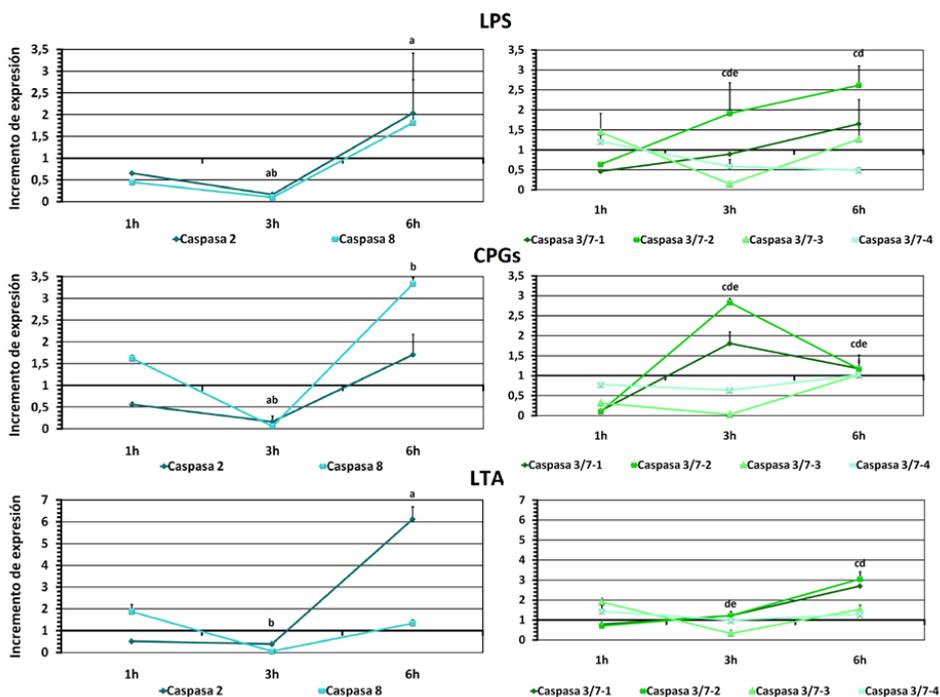


Figura 10. Inducción de las caspasas en hemocitos tratados con diferentes PAMPs (LPS, CPGs y LTA) a 1h, 3h y 6h post-tratamiento. Hemocitos estimulados con LPS, CPGs y LTA. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de pools de hemocitos experimentales. Los datos fueron analizados usando el test-t de Student. a, b, c, d, e y f indican diferencias significativas para $p < 0,05$ de las caspasas 2, 8, 3/7-1, -3/7-2, -3/7-3 y 3/7-4, respectivamente.

El compuesto zimosán (Figura 11) se empleó para estimular los hemocitos de mejillón con el fin de simular una infección fúngica, ya que este compuesto es un componente de la pared celular de las levaduras. Los niveles de expresión obtenidos en hemocitos tratados con zimosán fueron relativamente similares a aquellos descritos para tratamientos bacterianos. Hubo una regulación negativa y significativa de la expresión de las caspasas 2 y 8 a 3h post-tratamiento. Después de 6h post-tratamiento, los valores de expresión se situaron en torno a niveles similares registrados a 1h post-tratamiento (3 veces por encima del grupo control). Las caspasas ejecutoras 3/7-1 y 3/7-2 se regularon de manera positiva a las 3h y 6h; mientras que

la caspasa 3/7-4 se reguló de manera negativa y significativa a esos mismos intervalos de tiempo. No se registraron cambios significativos en la expresión de la caspasa 3/7-3. La cinética de la expresión génica tras la realización del tratamiento simulando infecciones virales con poly I:C (Figura 11) fue diferente a todos los tratamientos descritos previamente.

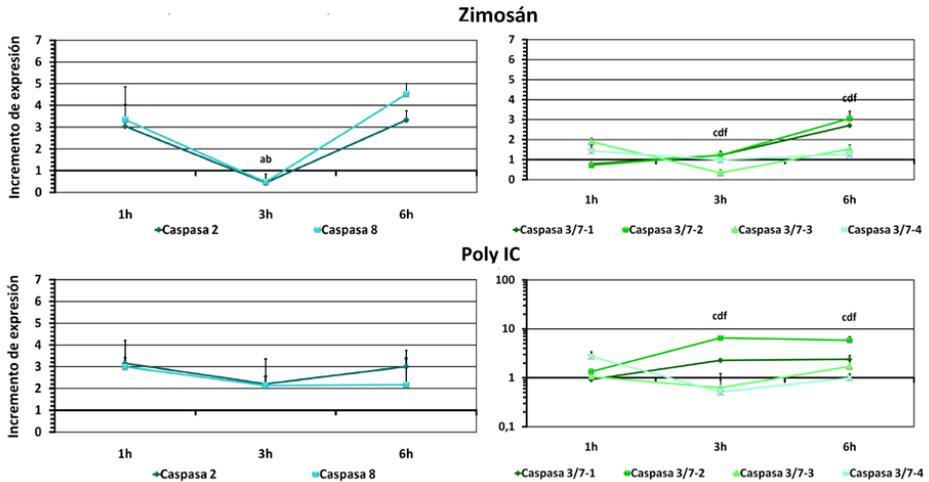


Figura 11. Inducción de las caspasas en hemocitos tratados con diferentes PAMPs (Zimosán y Poly IC) a 1h, 3h y 6h post-tratamiento. Hemocitos estimulados con zimosán y Poly IC. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de pools de hemocitos experimentales. Los datos fueron analizados usando el test-t de Student. a, b, c, d, e y f indican diferencias significativas para $p < 0,05$ de las caspasas 2, 8, 3/7-1, 3/7-2, 3/7-3 y 3/7-4, respectivamente.

A pesar de que los cambios en los niveles de expresión de ambas caspasas iniciadoras durante el curso de tiempo, no fueron significativos, mostraron aumentos superiores a dos veces respecto del control. La expresión de las caspasas ejecutoras 3/7-1 y 3/7-2 se incrementó significativamente a las 3h y 6h post-tratamiento alcanzando niveles superiores a las 34 veces respecto a los controles (un aumento de 34 veces se observó solamente para los valores de expresión de la caspasa 3/7-2). Sin embargo, las formas 3/7-1 y 3/7-2 registraron valores más bajos que el control a 1h post-tratamiento. No hubo cambios significativos en la expresión de la caspasa 3/7-3 pero la caspasa 3/7-4 se reguló de manera negativa y significativa a las 3h y 6h post-tratamiento.

II.3.6.2 ESTIMULACIÓN *IN VITRO* CON COMPUESTOS ORGANOCOLORADOS

Para evaluar el efecto de diferentes contaminantes en el sistema inmune de mejillón, los hemocitos fueron expuestos a altas concentraciones de PHAs y PCBs, componentes más frecuentes del petróleo. Los PHAs y PCBs son algunos de los agentes químicos responsables de la contaminación del medio marino causada por manchas de este hidrocarburo. Ambos compuestos indujeron cambios en los perfiles de expresión de genes, variando desde un aumento de 3 a 0,3 por debajo de los controles (Figura 12). El benzopireno indujo una regulación negativa y significativa de todas las caspasas a lo largo del curso de tiempo. A 1h post-tratamiento, todos los genes alcanzaron valores por encima de un valor de 1,5 veces pero la expresión fue disminuyendo gradualmente hasta las 6h post-tratamiento. En este punto, todos los genes registraron valores de expresión por debajo de los controles. Los resultados obtenidos tras el tratamiento de hemocitos con fenantreno, fueron opuestos a los que se acaban de describir. Con este tratamiento la expresión de todos los genes aumentó de manera significativa a lo largo del tiempo (Figura 12). Las caspasas 2, 3/7-1, 3/7-2 y 3/7-3 aumentaron su expresión de 1h a 3h post-tratamiento pero los niveles de expresión se incrementaron por encima del control a las 6h post-tratamiento. En este intervalo, la expresión estuvo situada por debajo de 2, para todos los genes. La expresión de las caspasas 3/7-4 y 8 aumentó a lo largo del tiempo y mostró valores por encima de 2,5 a las 6h post-tratamiento. El tratamiento con PCBs también dio lugar a una modulación de la expresión de los genes. Las caspasas iniciadoras 2 y 8 disminuyeron su expresión significativamente a las 3h y 6h post-tratamiento. Las caspasas ejecutoras 3/7-1 y 3/7-3 incrementaron su expresión con diferencias significativas, a las 3h y 6h post-tratamiento. La caspasa 3/7-4 disminuyó su expresión de manera significativa entre 1h y 3h, mientras que la caspasa 3/7-2 redujo su expresión entre 1h y 3h significativamente mientras que entre las 3h y 6h post-tratamiento aumentó con diferencias significativas su nivel de expresión.

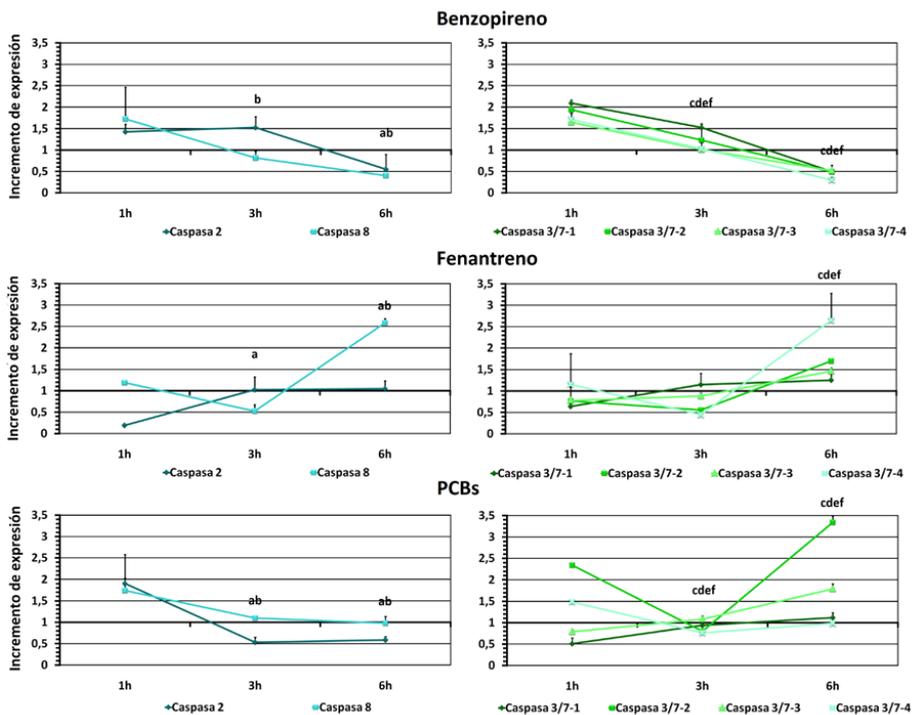


Figura 12. Modulación de la expresión de los genes caspasa en hemocitos tratados con los contaminantes benzopireno, fenantreno y PCBs. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de 4 pools de hemocitos. Los datos fueron analizados usando el test-t de Student. a, b, c, d, e y f indican diferencias significativas para $p < 0,05$ de las caspasas 2, 8, 3/7-1, 3/7-2, 3/7-3 y 3/7-4, respectivamente.

II.4 DISCUSIÓN

Sokolova (2009) ha subrayado la importancia del proceso apoptótico en el sistema de defensa inmune de los moluscos (Sokolova, 2009). Aunque recientemente, se ha descrito una caspasa 8 en el gasterópodo *Haliotis diversicolor* (Huang y col., 2010), existen pocas referencias que describan la presencia de caspasas o los efectos de los diferentes estímulos sobre la modulación y/o regulación, de los mecanismos apoptóticos en los moluscos bivalvos, a pesar de la importancia económica y ecológica de estos organismos.

En el presente trabajo, se caracterizaron 6 caspasas diferentes en el molusco bivalvo *Mytilus galloprovincialis* y también se llevó a cabo el análisis de la regulación de dichos genes, bajo exposiciones experimentales a sustancias genotóxicas y PAMPs. A partir de las estimaciones obtenidas con el programa BLAST, la predicción de los dominios estructurales y los análisis filogenéticos; se procedió a la clasificación de las secuencias proteicas de las caspasas iniciadoras y ejecutoras. El grupo de caspasas iniciadoras estuvo formado por 2 secuencias cuya identidad fue similar a caspasa 2 y caspasa 8; mientras que el grupo de las ejecutoras estuvo formado por 4 miembros con alta identidad a caspasa 3/7. A pesar de que se han caracterizado 6 caspasas, el mejillón mediterráneo probablemente contenga otras caspasas adicionales. El conjunto de caspasas iniciadoras (caspasa 2 y caspasa 8) es similar a las secuencias identificadas en otros modelos animales. Más concretamente, las caspasas 2 y 8 podrían ser homólogas a los genes de *Drosophila*, DREDD y DRONC, respectivamente (Lamkanfi y col., 2002; Robertson y col., 2006). Cabe destacar que hubo mayor variabilidad dentro del grupo de las caspasas ejecutoras. Debido a los bajos valores de identidad obtenidos entre las caspasas 3/7-1, 3/7-2, 3/7-3 y 3/7-4, se sugiere que estas secuencias podrían corresponder a diferentes proteínas más que constituir diferentes isoformas de una misma proteína. La presencia de diferentes isoformas de las caspasas ejecutoras ha sido ya descrita en diferentes phyla, abarcando desde humanos hasta esponjas (Cohen, 1997; Wiens y col., 2003). Sin embargo, tan sólo 3 de los 31 genes caspasa descritos en equinodermos han sido identificados como caspasas ejecutoras (Robertson y col., 2006). La presencia de múltiples caspasas ejecutoras en bivalvos podría reflejar una expansión específica de estas proteínas en moluscos, resaltando por tanto la importancia de la fase ejecutora en el proceso apoptótico de estos organismos. Además, dicha expansión de las caspasas ejecutoras podría ser la razón por la que estos genes sean considerados como divergentes mientras que las caspasas iniciadoras sean más conservadas. Las cuatro caspasas ejecutoras de mejillón contuvieron prodominios cortos y ambas conservaron el sitio activo de cisteína pentapéptido y el típico dominio p20-p10 que ha sido extensamente descrito en mamíferos (Earnshaw y col., 1999). Además, los residuos críticos aminoacídicos implicados en catálisis (Wilson y col., 1994), estuvieron bien conservados en las cuatro caspasas ejecutoras. Sin embargo, los residuos que conforman el bolsillo de unión para el ácido aspártico P1 en el sustrato, no se conservaron (Wilson y col., 1994) ya que las caspasas ejecutoras 3/7-3 y 4 presentaron dos sustituciones diferentes. Dado que estos residuos juegan un papel en

la determinación de la especificidad del sustrato de las caspasas, dichas especificidades pueden diferenciarse sustancialmente de aquellas presentes en otros miembros de esta familia de proteínas. Los aspectos estructurales más importantes de las caspasas iniciadoras están representados por los dominios CARD y DED en las caspasas 2 y 8, respectivamente. A pesar de que ya se ha sugerido que la apoptosis mediada por receptores de muerte podría ser no funcional en invertebrados no cordados (Sokolova, 2009), la presencia de ambos dominios iniciadores en mejillón, concuerda con varias descripciones publicadas previamente, acerca de la existencia de proteínas que contenían dominios de muerte en otros invertebrados (Muzio, 1998; Bridgham y col., 2003), sugiriendo la posible existencia de un mecanismo mediado por receptores de muerte en estos organismos. La caspasa 2 de mejillón carece del sitio activo pentapéptido conservado de cisteína, lo cual indica que podría representar una proteína reguladora no proteolítica tipo caspasa análoga a la proteína de mamífero CLARP (*caspase-like apoptosis-regulatory protein*) (Inohara y col., 1997). La caspasa 2 de mejillón también carece del típico dominio p20 compartido por muchas otras caspasas homólogas. Podría ser que esta forma de caspasa fuese una variante de una caspasa completa funcional en mejillón. Esto parece indicar una posible función reguladora para la forma truncada de la caspasa 2 de manera similar a otras formas truncadas descritas en humanos (Zhitovskiy y Orrhenius., 2005). La caspasa 8 de mejillón posee características estructurales que la hacen diferente a otras proteínas homólogas. El programa SMART predijo la presencia de un solo dominio DED en lugar de dos dominios DED tal y como se ha descrito en vertebrados más desarrollados (Earnshaw y col., 1999), tunicados (Sakata y col., 2007), equinodermos (Robertson y col., 2006) y anélidos (secuencias no publicadas disponibles en GenBank cuyo número de acceso es: FJ890021.1). El dominio DED estuvo ausente en la oreja de mar (*Haliotis diversicolor*) (Huang y col., 2010) y en el langostino (*Marsupenaeus japonicus*) (Wang y col., 2008).

Después de analizar los patrones de expresión de las caspasas en tejidos de mejillón, se podría concluir que la cinética de expresión de estos genes va acorde con la fisiología y función de cada órgano. La glándula digestiva mostró valores de expresión extremadamente altos para cada una de las caspasas, alcanzando niveles por encima de las 106 veces sobre el valor de expresión registrado en músculo. El proceso apoptótico en la glándula digestiva podría ser bastante importante dado que este órgano constituye la primera entrada potencial de patógenos y ello está

correlacionado con una alta prevalencia de parásitos. Por ejemplo, el copépodo *Mytilicola intestinalis* registró un porcentaje de prevalencia de casi el 83% en poblaciones de mejillón. Este parásito daña el epitelio intestinal de los mejillones infectados (Figueras y col., 1991); por eso, el proceso apoptótico se presenta como un mecanismo importante para la eliminación de las células dañadas y mantenimiento de la integridad estructural del epitelio digestivo. También se observaron elevados valores de expresión de caspasas en branquias, donde la apoptosis podría tener un papel similar al descrito en el tracto digestivo. Las branquias están expuestas a condiciones ambientales y contaminantes, por lo que también se ven afectadas por parásitos (Figueras y col., 1991; Villalba y col., 1997; Canestri y col., 1998), los cuales pueden causar reacciones patológicas en este tejido como la desorganización de los filamentos branquiales que conlleva a una reducción de la capacidad de alimentación del mejillón (Robledo y col., 1994). La expresión de las caspasas en hemocitos fue también alta, tal y como describieron previamente varios autores (Terahara y Takahashi, 2008; Sokolova, 2009). Esta respuesta no es sorprendente dado que los hemocitos son las células inmunes de los bivalvos y la apoptosis ha sido descrita como un mecanismo de defensa del hospedador contra los parásitos, virus y patógenos bacterianos (Koyama y col., 2003; DeLeo, 2004; Terahara y Takahashi, 2008). Los otros tejidos: músculo, manto, gónadas y pie, registraron valores de expresión medios o bajos.

Con el objetivo de comprender los mecanismos de regulación de las caspasas, se expusieron hemocitos de mejillón a diferentes estímulos y el nivel de apoptosis se evaluó mediante microscopía, citometría de flujo y técnicas de PCR cuantitativa. Se empleó un tratamiento con UV para inducir el mecanismo intrínseco de apoptosis, durante 45 minutos. Se sabe que el UV activa el mecanismo estrés kinasa (JNK, MAPK), induce daño a la mitocondria y al ADN y en consecuencia, desencadena la apoptosis mediada por caspasas, en una gran variedad de cultivos celulares (Wolbers y col., 2004). Las observaciones microscópicas revelaron que los hemocitos afectados sufren cambios morfológicos y fisiológicos tales como el encogimiento celular, la condensación de la cromatina y la formación de cuerpos apoptóticos constituidos por citoplasma unido a la membrana, fragmentos nucleares y orgánulos similares a aquellos ampliamente descritos por Kerr y colaboradores (1972). En base a las poblaciones de hemocitos descritas por García-García y col. (2008), se analizaron los niveles de apoptosis por citometría de flujo en las regiones R1 (granulocitos) y R2 (hialinocitos). A pesar de que las dos poblaciones fueron susceptibles al tratamiento

con luz ultravioleta, los daños inducidos en la población de hialinocitos fueron detectados con anterioridad (0h post-tratamiento) a los daños inducidos en la población de granulocitos (24 horas post-tratamiento). Podría ser que los gránulos citoplasmáticos de los granulocitos tuviesen algún efecto protector contra la radiación ultravioleta, de manera similar a un fenómeno descrito en los melanocitos de la piel humana (Prota, 1994). En las caspasas iniciadoras, los resultados de PCR cuantitativa mostraron altos valores de expresión en todos los puntos de muestreo para la caspasa 8. A pesar de que esta caspasa está implicada principalmente en la iniciación de la apoptosis por el mecanismo extrínseco (Boatright y Salvesen, 2003; Ho y Hawkins, 2005), el resultado obtenido fue el esperado dado que también se ha descrito la participación de este gen en el mecanismo intrínseco apoptótico a través de la rotura del dominio de muerte agonista interactuador de la proteína BH3-only, BID (Luo y col., 1998). Se detectaron bajos niveles de caspasa 2 a 0, 1 y 24 horas post-tratamiento, con niveles de expresión más elevados a las 3h y 6h post-tratamiento. Se sabe que la caspasa 2 puede ejercer un papel funcional al inicio de la cascada apoptótica en la permeabilización de la mitocondria tras la exposición a la radiación ultravioleta. Estaría también implicada en la translocación del gen Bax hacia la mitocondria y en la posterior liberación del citocromo C y la molécula Smac/DIABLO (Zhivotovsky y Orrenius, 2005). La caspasa 2 de mejillón podría poseer una función diferente a la forma truncada de esta misma caspasa bien induciendo (2L) o suprimiendo (2S) la muerte celular (Wang y col., 1994). Los resultados muestran como la caspasa 2 de mejillón es regulada por UV pero a la vista de los patrones de expresión obtenidos en este trabajo, no se podría concluir si posee un papel inductor o supresor. En lo que a las caspasas ejecutoras se refiere, éstas estuvieron siempre reguladas de manera negativa. Las caspasas 3/7-3 y 3/7-4 mostraron un pico máximo de expresión después de 1h y 3h post-estimulación, respectivamente. La cinética observada podría reflejar una activación secuencial de estas dos formas. Por otra parte, una infección bacteriana podría desencadenar la apoptosis mediante la modulación de la expresión de las caspasas. Esta respuesta ha sido descrita en la gran mayoría de organismos vertebrados, desde mamíferos (Lancellotti y col., 2006; Reis y col., 2007) hasta invertebrados: *Haliothis diversicolor* (Huang y col., 2010) y *Litopenaeus vannamei* (Chang y col., 2008).

La estimulación de los hemocitos con LPS, LTA y CPGs indujo una regulación positiva de ambas caspasas iniciadoras (2 y 8) y ejecutoras (3/7-1 y 3/7-2). Esta

respuesta se ha observado previamente en moluscos, con una regulación positiva del gen caspasa 8 en oreja de mar (*H. diversicolor*) tras una infección bacteriana llevada a cabo bajo condiciones experimentales (Wang y col., 2008; Huang y col., 2010) y en crustáceos (*L. vannamei*), con un aumento de la expresión de la caspasa 3 después de una infección con *Vibrio alginolyticus* (Chang y col., 2008). Es interesante señalar que hubo una regulación negativa en la caspasa 3/7-3 a las 3 horas post-tratamiento y que no se detectó ningún cambio importante en los niveles de expresión de la caspasa 3/7-4. Esto apoya la idea de que las diferentes caspasas ejecutoras podrían responder a diferentes estímulos, los cuales estarían relacionados con la afinidad por el sustrato basado en su estructura específica, ya mencionada anteriormente.

La modulación de la expresión de las caspasas por infecciones virales ha sido confirmada en humanos (Best y Bloom, 2004) pero también en algunas especies de invertebrados como lepidópteros, coleópteros (Williams y col., 2009) y en el langostino marino *M. japonicus*. En esta especie, la infección por el virus de la mancha blanca, indujo una regulación positiva significativa de las caspasas 3 y 8 (Wang y col., 2008). El tratamiento de los hemocitos de mejillón con poly I:C indujo una disminución en los niveles de expresión de las caspasas iniciadoras (2 y 8) y también en las caspasas ejecutoras 3/7-3 y 3/7-4. Las otras caspasas ejecutoras (caspasa 3/7-1 y caspasa 3/7-2) fueron reguladas de manera positiva, con el mayor efecto después de las 3h post-tratamiento. Estos resultados podrían sugerir una especialización de la caspasa 3/7-1 y 3/7-2 en la respuesta inmune del mejillón contra virus.

Los resultados obtenidos en hemocitos de mejillón tratados con zimosán, sugieren que la apoptosis podría estar implicada en la protección inmune contra infecciones de levaduras, de manera similar a lo que ocurre en episodios de hongos patógenos en humanos (Allen y Deepe, 2005). Se han encontrado diferencias en los patrones de expresión de las caspasa iniciadoras y ejecutoras contra varios PAMPs, tanto entre ambos grupos como dentro de cada uno de ellos. Sin embargo, tomando en conjunto todos los resultados podemos concluir que parecen existir respuestas específicas de caspasas a bacterias y patógenos virales.

Se ha descrito que los contaminantes poseen varios efectos sobre el sistema inmune de moluscos, induciendo inmunosupresión (Wootton y col., 2003) y activando diferentes mecanismos celulares como la apoptosis (Baier-Anderson y Anderson, 2000; Gagnaire y col., 2006). Los resultados obtenidos en el análisis de expresión génica en

hemocitos expuestos a contaminantes, mostraron un efecto pleiotrópico de los tratamientos. Mientras que el benzopireno indujo una regulación negativa de todas las caspasas reflejando un efecto inmunosupresor, los tratamientos con fenantreno y PCBs parecen haber inducido el proceso apoptótico a través de la regulación positiva de todas las caspasas. Los resultados de este experimento se correlacionan con trabajos previos a pesar de que la magnitud de la respuesta fue dependiente de la dosis y el tiempo de exposición a los contaminantes (Baier-Anderson y Anderson, 2000; Wootton y col., 2003; Gagnaire y col., 2006).

En base a los resultados obtenidos y expuestos en el presente capítulo, se sugiere que el proceso apoptótico en moluscos bivalvos podría estar controlado a través de la regulación positiva y negativa de los genes caspasa. Sin embargo, con los datos que aquí se presentan, no se puede pasar por alto la dificultad de distinguir entre el porcentaje de mortalidad producido por muerte celular programada y la mortalidad ocasionada por procesos no apoptóticos. La apoptosis aquí descrita posee una complejidad similar a la de vertebrados, pero también reúne características únicas que podrían guardar relación con requerimientos específicos impuestos por la naturaleza sedentaria típica de los moluscos y su respuesta inmunológica desencadenada por las exposiciones reiterativas, a cambios ambientales, contaminantes y patógenos.

CAPÍTULO III

IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN
EL MECANISMO APOPTÓTICO MITOCONDRIAL
EN *Mytilus galloprovincialis*

III.1 INTRODUCCIÓN

Los moluscos se distribuyen a lo largo de una gran variedad de hábitats distintos tales como ambientes marinos, de agua salobre, de agua dulce o incluso terrestres; donde desempeñan papeles de vital importancia. En los últimos años, la presencia de contaminantes en los ecosistemas marinos ha aumentado notablemente hasta alcanzar niveles preocupantes (Borja y col., 2008) debido a la acción que sobre ellos ejercen las actividades de origen antropogénico. Los moluscos bivalvos están continuamente expuestos a parámetros ambientales los cuales imponen condiciones estrictas a veces incompatibles con la vida de estos organismos. El éxito ecológico de los moluscos bivalvos, como la especie *Mytilus galloprovincialis*, se basa en su capacidad para modificar las funciones fisiológicas y en consecuencia afrontar los cambios ambientales a los que se ven sometidos. Es por ello que las respuestas biológicas de estos y otros invertebrados marinos, han sido empleadas para analizar el impacto de los contaminantes en los ecosistemas (Everaarts y Sarkar, 1996; Fernández-Tajes y col., 2011).

La apoptosis es uno de los mecanismos más importantes implicados en procesos de adaptación al estrés ambiental y ecológico (LeGrand, 1997). Diferentes parámetros como las altas temperaturas, los cambios en la salinidad o la presencia de contaminantes inducen apoptosis en las células de moluscos a través del mecanismo intrínseco o mitocondrial (Bettaieb y Averill-Bates, 2005; Goedken y col., 2005; Baršienė y col., 2008).

La radiación ultravioleta posee varias propiedades que combinadas hacen de ella un potente estresante ambiental para los organismos que están expuestos a la luz del sol como los organismos marinos. El aumento de la exposición a este tipo de radiación puede alterar la composición de las comunidades marinas, distribución de tamaños así como su productividad (Häder y col., 2007). A nivel molecular, la radiación ultravioleta puede inducir daño a los lípidos, proteínas y ADN, dando lugar a una gran variedad de efectos sub-letales y letales (Dahms y Lee, 2010). La luz ultravioleta (UV) es un agente exógeno potente capaz de inducir daño oxidativo al ADN, a través de la generación de altos niveles de especies de oxígeno reactivas (ROS) (Pelicano y col., 2004), afectando a su integridad y en consecuencia dando lugar a que se fragmente. La evaluación de la integridad del ADN es una medida que depende del proceso apoptótico (Nagata, 2000) y de manera frecuente, su análisis se ha llevado a cabo

utilizando técnicas de electroforesis (Gong y col., 1994) o ensayos Comet (Mitchelmore y Chipman, 1998). Sin embargo estos ensayos necesitan grandes números de células apoptóticas y son relativamente insensibles a la detección de niveles bajos de apoptosis (Singh, 2000). Por otra parte, la producción de ROS es una respuesta común a cambios ambientales en muchos invertebrados marinos como los moluscos bivalvos, y que pueden ser responsables de la inducción de apoptosis en las células de estos animales (Auffret y Oubella, 1997; Terahara y Takahashi, 2008). Aún así, ningún estudio ha demostrado todavía si el UV puede desencadenar la producción de ROS en bivalvos y tampoco cual es la implicación de éste en la inducción de la apoptosis celular en moluscos (Terahara y Takahashi, 2008). Cabe destacar que el reciente aumento de datos genómicos y proteómicos en varias especies como el género *Mytilus* ha revelado la existencia de muchos genes nuevos y secuencias proteicas que poseen un potencial como biomarcadores de contaminación (Snape y col., 2004; Apraiz y col., 2006; Bjørnstad y col., 2006; Dondero y col., 2006; Venier y col., 2006; Sánchez y col., 2011; Campos y col., 2012). Sin embargo, la mayoría de genes que poseen un papel clave en el proceso apoptótico mitocondrial no han sido descritos en moluscos (Terahara y Takahashi, 2008; Sokolova, 2009).

En los últimos años se ha confirmado la implicación de la familia de proteínas Bcl-2 en la regulación del mecanismo apoptótico mitocondrial en mamíferos (Ekert y Vaux, 2005). La proteína B-cell lymphoma 2 (Bcl₂) fue el primer ejemplo de oncogen capaz de inhibir la muerte celular y no producir proliferación. En el año 1988, Vaux demostró que las células β transfectadas con Bcl₂ eran más resistentes a la apoptosis inducida por la retirada de la interleuquina 3 (IL-3). Por primera vez, se demostraba que el mecanismo que conducía a la generación de tumores dependía no sólo de la capacidad para escapar del control del crecimiento sino también de la capacidad para prevenir la apoptosis (Vaux, 1988). A principios del año 2000, hubo una gran controversia acerca del papel de la familia Bcl-2 en el control de la apoptosis. Mientras que una teoría defendía que los miembros de esta familia controlaban directamente la activación de las caspasas (Strasser, 2000), otra apoyaba la idea de que estos genes podían, principalmente, actuar como guardianes de la integridad mitocondrial (Wang, 2001). En el año 2002, Cory y Adams confirmaron que la función central de los miembros de la familia Bcl-2 de mamíferos era la de velar por la integridad de la mitocondria y controlar la liberación de las proteínas mitocondriales hacia el citoplasma. A nivel estructural, esta familia de proteínas está caracterizada por la

presencia de motivos constituidos por secuencias conservadas y conocidos como dominios de homología Bcl-2. La familia de proteínas Bcl-2 se puede subdividir en tres subclases atendiendo a una serie de criterios. En base a la influencia que ejercen sobre el proceso apoptótico (Figura 1) se distinguen genes pro-apoptóticos como aquellos que promueven la permeabilización mitocondrial; y genes anti-apoptóticos, aquellos que inhiben la apoptosis por heterodimerización a través de las proteínas pro-apoptóticas. Según el número de regiones BH de la secuencia proteica homólogas a la proteína anti-apoptótica Bcl₂ (Circu y Aw, 2008), se distinguen tres grupos (Figura 1):

Efecto sobre la apoptosis	Número de regiones BH
PROTEÍNAS PRO-APOPTÓTICAS	<p>Proteínas tipo Bax</p> <p><i>Dominios BH1, BH2 y BH3</i></p> <p>Bax, Bak y Bok/Mtd</p>
	<p>Proteínas BH3-only</p> <p><i>Dominio corto único BH3</i></p> <p>Bid, Bim/Bod, Bad, Bmf, Bik/Nbk, BIK, Noxa, Puma/Bbc3 y Hrk/DP5</p>
PROTEÍNAS ANTI-APOPTÓTICAS	<p>Proteínas Bcl-2</p> <p><i>Dominios BH1-BH4</i></p> <p>Bcl₂, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 y A1/Bfl-1</p>

Figura 1. Clasificación de la familia de proteínas Bcl-2

- Proteínas pro-apoptóticas tipo Bax: Son proteínas multiregión responsables de la permeabilización de la membrana mitocondrial más externa (MOMP) y efectoras de la apoptosis. Se cree que aquellas células que carecen de la proteína Bax (Bcl-2 associated X) y Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) no sufren MOMP y apoptosis en respuesta a estímulos de muerte (Wei y col., 2001). Bax es un monómero citosólico

en células viables pero durante la apoptosis cambia su conformación, se integra en la membrana interna mitocondrial y sufre oligomerización (Nechushtan, 2001). Aunque también existe controversia acerca del papel de Bax y Bak, se cree que ambos genes contribuyen a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial mediante la formación de canales (Antonsson y col., 2000) e interacción con componentes del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) como el canal anión dependiente del voltaje (VDAC) (Tsujiyama, 2000). Por otra parte, los miembros Bcl-2 anti-apoptóticos secuestran a los miembros pro-apoptóticos mediante la unión a sus dominios BH3, evitando así la activación/oligomerización del Bax o Bak y en consecuencia inhibiendo los eventos pro-apoptóticos mitocondriales. La activación del Bax resulta de un proceso constituido por varios pasos altamente regulados, y que implican su translocación desde el citosol a la membrana externa mitocondrial donde se inserta y oligomeriza.

- Proteínas pro-apoptóticas BH3-only: Son aquellas proteínas que solamente poseen una secuencia homóloga en la región BH3 y por ello se las denomina *BH3-only*. Estas proteínas integran y transmiten las señales de muerte procedentes de procesos celulares defectuosos, a otros miembros de la familia Bcl-2. Algunas proteínas de este grupo (Bid, Bim y Puma) reciben el nombre de proteínas activadoras *BH3-only*, ya que inducen directamente la MOMP dependiente del Bax y Bak (Kim y col., 2006). A través de su dominio BH3, las *BH3-only* regulan a otras proteínas anti-apoptóticas, como el Bcl₂ y Bcl-xL para inhibir su función y/o interactuar directamente con las proteínas multidominio Bax o Bak y estimular su actividad (Cory y Adams, 2002; Mund, 2003). Otras proteínas de este grupo, se denominan "sensibilizadoras" (Bad, Noxa, Bmf, Hrk) puesto que promueven la apoptosis por unión a las proteínas anti-apoptóticas induciendo la liberación de otras *BH3-only* activadoras (Letai y col., 2002; Certo y col., 2006) o el Bax/Bak activado (Willis y col., 2005; Uren y col., 2007; Billen y col., 2009). Si bien se han encontrado en moluscos algunas proteínas como la ITM2Bs (Moreira y col., 2012b) que podrían guardar relación con moléculas homólogas a las *BH3-only* de mamíferos (Fleischer y col., 2002; Fleischer y Rebollo, 2004), la presencia de éstas en invertebrados no está clara y cuanto menos en moluscos bivalvos. Dado que solo existen dos trabajos que versan sobre el gen ITM2Bs, y ambos se centran en vertebrados, se necesitaría profundizar mucho más en su estudio y comprobar si este gen podría desempeñar una función similar al Bid en invertebrados (Fleischer y col., 2002; Fleischer y Rebollo, 2004).

- Proteínas anti-apoptóticas tipo Bcl-2: Poseen varios dominios (BH1-4). Este grupo incluye las proteínas Bcl₂, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 y A1/Bfl-1. Las proteínas Bcl₂ y Bcl-xL inhiben al Bax y Bak, proteínas esenciales para inducir la MOMP y la liberación del citocromo C. El Bcl₂ y el Bcl-xL inhiben potencialmente la apoptosis en respuesta a diversas alteraciones citotóxicas, entre otras, mediante la supresión de la generación de ROS, estabilizando el $\Delta\psi$, previniendo el MPT y en consecuencia bloqueando la liberación del citocromo C (Reed, 1998). La apoptosis también está regulada por varios elementos y en particular, por la familia de polipéptidos homólogos al Bcl₂ que juega un importante papel en este proceso. Entre las proteínas de esta familia, el Bcl-x está localizado de manera predominante en las membranas mitocondriales. Este gen posee tres formas de transcripción alternativas: Bcl-xL(α), Bcl-x(β) y Bcl-xS(γ) (Boise y col., 1993; González-García y col., 1994). La forma (α) suprimiría la muerte celular mientras que la forma (γ) induciría el proceso apoptótico, formando dímeros con Bcl-xL o Bcl₂, neutralizando las actividades de estas proteínas anti-apoptóticas y por tanto, facilitando la apoptosis (Boise y col., 1993; Fang y col., 1994; Minn y col., 1996). González-García y colaboradores (1994) encontraron la forma Bcl-x(β) en ratón la cual podría tratarse de una proteína soluble intracelular que bloquearía la muerte celular. A pesar de que el Bcl-xS fue una de las primeras proteínas pro-apoptóticas aisladas, se sabe muy poco de su mecanismo de acción y papel en la muerte celular fisiológica. Existen varios estudios previos que confirman que esta proteína podría estar implicada en procesos de apoptosis (Heermeier y col., 1996; Dixon y col., 1997; Igase y col., 1999). Châtel y col. (2011) indujeron la expresión de un gen homólogo a Bcl-xS tras la exposición de hemocitos de mejillón mediterráneo a agua oxigenada (H₂O₂) y los agentes genotóxicos tributiltin (TBT) y gasoil; mediante la activación diferencial del mecanismo MAPK seguido de la activación de la caspasa 3. Otros autores han confirmado que la forma anti-apoptótica (α) Bcl-xL, podría regular la liberación del citocromo C conduciendo así al desencadenamiento de la apoptosis (Shimizu y col., 1999). Cabe también destacar la reciente aparición en la ostra *C.gigas* de una secuencia asociada al Bcl₂, el gen Bag. Se trata de un gen anti-apoptótico con capacidad para modular las HSPs 70 y restablecer la función del DJ1, un gen con función neuroprotectora contra la aparición del Parkinson en humanos (Chen, 2012; Zhang y col., 2012).

Poco se sabe de esta familia de genes en moluscos y a fecha de hoy, no existe ninguna descripción formal de esta familia de proteínas a pesar de que una secuencia

completa de un homólogo de Bcl₂ de la ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*) está disponible en la base de datos GenBank. En mamíferos, se han descrito más de treinta genes pertenecientes a la familia Bcl-2 (Borner, 2003). En invertebrados, se ha descrito el gen CED-9, un homólogo del Bcl₂ de humano, en el nematodo *Caenorhabditis elegans* mientras que en *Drosophila*, se han identificado dos genes: el Debcl y Buffy. El análisis del genoma de *Hydra magnipapillata* permitió la identificación de siete proteínas anti-apoptóticas tipo Bcl₂, cuatro proteínas *BH3-only* y dos proteínas con dominios tipo Bak (Lasi y col., 2010a). En erizo de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) se han encontrado diez secuencias con dominios homólogos al Bcl₂. (Wiens y col., 2001; Robertson y col., 2006; Lasi y col., 2010a; Lee y col., 2011).

Otra proteína anti-apoptótica reguladora de la familia de proteínas Bcl-2 es el inhibidor de Bax 1 (BI-1) (Xu y Reed, 1998). Esta proteína multifuncional, además de controlar la apoptosis mitocondrial, interactúa físicamente con las proteínas Bcl₂ y Bcl-xL en la membrana del retículo endoplasmático (ER), y al igual que éstas se le ha asociado con la homeostasis intracelular dependiente de calcio (Kim y col., 2009). El BI-1 pertenece a una familia de seis genes (TMBIM1-6) que contienen el motivo transmembrana inhibidor de Bax. El BI-1 es una proteína altamente conservada a lo largo de la evolución. Existen homólogos en una gran variedad de organismos, desde bacterias hasta plantas (Henke y col., 2011). El BI-1 fue identificado y caracterizado por primera vez en un screen de proteínas de humano por ser capaz de inhibir la muerte celular mediada por el gen pro-apoptótico Bax en levaduras (Xu y Reed, 1998). Desde entonces, varios grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en investigar el efecto del BI-1 en la muerte celular en varios organismos vertebrados e invertebrados modelo sin embargo, no existe información alguna en relación a moluscos marinos (Lasi y col., 2010b; Henke y col., 2011; Lee y col., 2011)

Los p53s son una familia bien caracterizada de reguladores transcripcionales, que actúan para promover la expresión de genes controlando los procesos de modificación del ADN y reparación, carcinogénesis y apoptosis. El gen p53 fue descubierto por primera vez en 1979 (DeLeo y col., 1979; Lane y Crawford, 1979; Linzer y Levine, 1979; Muttray y col., 2005) y desde entonces, muchos estudios han ilustrado su importancia y prueba de ello son las diferentes acepciones que ha recibido tales como “el guardián del genoma” o el “centro de la red” (Vogelstein y col., 2000) dada su implicación en las redes moleculares que deciden el destino de la vida y la muerte celular. Asimismo, se ha demostrado que el p53 sufre mutación o inactivación

en más del 50% de los cánceres humanos (O'Brate y Giannakakou, 2003). Este gen media el proceso apoptótico mitocondrial bien a través de la translación hacia el núcleo, donde regula la transcripción de genes pro-apoptóticos, o mediante su transferencia hacia la mitocondria donde inactiva proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Böttger y col., 2008), modulando la expresión del Bcl₂, Bcl-xL y Bcl-xS (Chiu y col., 2003; Banni y col., 2009). Las funciones de las proteínas homólogas a este gen se han investigado en tan sólo unos pocos invertebrados (moscas, nematodos y recientemente una anémona de mar) (Walker y col., 2011). El primer gen identificado como p53 en un molusco correspondió al calamar *Loligo forbesi* (Ishioaka y col., 1995). Posteriormente se comprobó, que esa secuencia poseía una mayor similitud con p63/p73, homólogos muy próximos al p53. En lo que a bivalvos se refiere, Kelley y col. (2001) aislaron un p53 de la almeja *Mya arenaria*. Al año siguiente, Jessen-Eller y col. (2002) obtuvieron un homólogo de este gen en *Spisula solidissima*. En el año 2005, Muttray y colaboradores identificaron otros dos p53 en las especies de mejillón *Mytilus edulis* y *Mytilus trossulus* (Muttray y col., 2005) mientras que Farcy y colaboradores (2008) caracterizaron un homólogo de este gen en la ostra japonesa (*C.gigas*). Debido a su papel central en la regulación del ciclo celular y en la respuesta al estrés celular, los miembros de la familia p53 han sido propuestos como marcadores de estrés celular en el mejillón (St.-Jean y col., 2005).

El p53 participa en la cascada apoptótica activando y regulando genes localizados al final de la red apoptótica y los mecanismos que median este proceso han sido extensamente investigados en humanos. Uno de los genes modulados por el p53 es el gen regulador del daño al ADN y p53 (PDRP) (Luo y col., 2003). Se ha visto que la luz UV regula de manera positiva la expresión de este gen pero sin embargo, ésta se ve afectada de manera negativa por el p53. El PDRP ha sido muy poco estudiado; hasta la fecha, tan sólo se han publicado dos trabajos que caracterizan este gen en mamíferos (Luo y col., 2003; Jiang y col., 2011) y en invertebrados no hay referencias previas.

Uno de los cambios morfológicos que experimentan las células que sufren apoptosis es la fragmentación del ADN. El factor de fragmentación del ADN o DFF, juega un papel crítico en la apoptosis dependiente de caspasas y, estructuralmente esta proteína heterodimérica está compuesta por dos subunidades: una de 40 kilodaltons (kDa) (DFF40 o CAD) que posee la capacidad de fragmentar el ADN, y otra de 45kDa (DFF45), también conocida como inhibidor de CAD (ICAD), su inhibidor (Liu

y col., 1997). En estado normal, el DFF45 inhibe la actividad de la fragmentación del ADN uniéndose al DFF40. Una vez iniciada la señal de muerte, el DFF45, pero no el DFF40, actúa de sustrato de la caspasa 3 activa, rompiéndose en tres fragmentos proteolíticos y liberando el DFF40 el cual ejecuta la fragmentación del ADN. Inohara y colaboradores, descubrieron en el año 1998, nuevos miembros pertenecientes al sistema DFF, como las proteínas de la familia CIDE (proteínas efectoras tipo DFF45 inductoras de muerte). Un análisis sobre el proceso evolutivo de las proteínas de la familia DFF, ha revelado la existencia de ortólogos de este gen en organismos inferiores como la anémona de mar, sugiriendo que la fragmentación del ADN en la apoptosis es un proceso que se ha conservado a lo largo de la evolución (Eckhart y col., 2007). No existe ninguna referencia sobre la caracterización de esta familia de proteínas en moluscos.

El uso de moduladores apoptóticos, con capacidad pro y anti-apoptótica, permite estudiar la implicación de las diferentes rutas de señalización en la maquinaria de destrucción celular programada. El N-acetil-L-cisteína (NAC) es un thiol, agente mucolítico y precursor de la L-cisteína y glutatión. El NAC es una fuente celular de grupos sulfhidrilo y quelante de radicales libres dado que interactúa con las especies de oxígeno reactivas (Aruoma y col., 1989). El NAC es muy conocido por su actividad antioxidante y de manera frecuente se emplea para estimar la contribución del ROS al proceso apoptótico inducido por varios estímulos (Kulms y col., 2002; Risso-de Faverney, 2004). Numerosos estudios llevados a cabo en varios tipos celulares confirmaron la capacidad anti-apoptótica de este compuesto (Abello y col., 1994; Galle y col., 1999; Martin y col., 2000) pero sin embargo, se ha desatado gran controversia puesto que en varios trabajos se comprobó como los efectos del NAC eran totalmente opuestos y se observó una capacidad promotora de la apoptosis para este compuesto (Tsai y col., 1996; Chang y col., 1999; Rieber y Rieber, 2003) sugiriendo que el efecto del NAC podría ser dosis-dependiente (Zafarullah y col., 2003). Otro antioxidante conocido es el pirrolidín ditiocarbamato (PDTC). Al igual que el NAC, este compuesto contiene grupos thiol y se ha sugerido que podría inhibir de manera específica la inducción del NF- κ B (Li y col., 2006). El PDTC también posee la capacidad de actuar como agente pro y anti-apoptótico en diferentes tipos celulares (Tsai y col., 1996; Ozaki y col., 1997; Saeij y col., 2003). Varios autores han demostrado que el PDTC puede afectar a la liberación del citocromo C inducida por UV y por tanto alterar la producción de apoptosis (Kulms y col., 2002).

El inhibidor reversible 1-(4-metilfenil)-2-(4,5,6,7-tetrahidro-2-imino-3(2H)-benzotiazolil)etanona-monohidrobromido (PFT- α) posee la capacidad de suprimir la apoptosis mediada por el p53 y la transcripción de genes dependientes de dicho gen. La confirmación mediante varios estudios llevados a cabo tanto *in vitro* como *in vivo*, de que el PFT- α protegía diferentes tipos celulares de la apoptosis dependiente del p53 inducida por una variedad de estímulos, llevó a que este compuesto fuese considerado como un inhibidor específico. Ello dio lugar a que sea usado con frecuencia en estudios cuyo cometido sea distinguir entre sistemas apoptóticos dependientes e independientes del p53 (Komarov y col., 1999; Gudkov y Komarova, 2003; Sohn y col., 2009).

La ciclosporina A (CsA) es un estabilizador de la membrana celular que bloquea la formación del MPT e inhibe la apoptosis (Zhang y col., 2008). El tratamiento con CsA está asociado con un efecto inmunosupresor, bien mediante la unión a la proteína citosólica ciclofilina-A (CyP-A) conformando un complejo CyP-A-CsA inhibitorio de la calcineurina (fosfatasa clave para la activación de las células T) (Liu y col., 1991) o con la promoción de la supervivencia celular a través de su unión a otra ciclofilina, la D (CyP-D), esencial para la formación del MPT (Fournier y col., 1987). En este caso, también parece ser que el efecto de este compuesto podría ser dosis-dependiente (Elimadi y col., 1997; Lopes y col., 2003; Bustamante y col., 2004).

Robert Smith diseñó el compuesto N-benziloxicarbonil-Val-Ala-Asp (O-Me) fluorometil ketona (Z-VAD-FMK), un inhibidor de caspasas clave para los estudios de apoptosis y que supone una herramienta de gran interés en investigación (Van Noorden, 2001). Se trata de un reactivo no selectivo e inhibidor de caspasas cuya actividad ha sido demostrada en mamíferos, *Drosophila* y ostra (*C. gigas*) (Pronk y col., 1996; Bose y col., 1998; Lacoste y col., 2002).

Con el fin de caracterizar la apoptosis mitocondrial en moluscos bivalvos, y más concretamente en *M. galloprovincialis* así como desarrollar nuevas herramientas para estimar la respuesta de organismos marinos a agentes genotóxicos, en el presente capítulo se describen seis nuevos genes asociados con el mecanismo apoptótico intrínseco. Se evalúa la modulación del proceso apoptótico mediante el uso de compuestos inhibidores selectivos, y se estudia la expresión de los nuevos genes caracterizados a través de PCR cuantitativa tras el tratamiento con UV con o sin los diferentes moduladores apoptóticos.

III.2 MATERIAL Y MÉTODOS

III.2.1 ANIMALES DE ESTUDIO

Se obtuvieron ejemplares de mejillones adultos (*M. galloprovincialis*) en una planta comercial de depuración de moluscos bivalvos situada en la Ria de Vigo. Los animales se mantuvieron en acuarios en circuito abierto con agua de mar filtrada y aireación, a una temperatura de 15°C. Los mejillones se alimentaron cada día con una dieta a base de: *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* y *Skeletonema costatum*. Los bivalvos se aclimataron durante una semana antes de iniciar los experimentos.

III.2.2 SELECCIÓN DE SECUENCIAS Y AMPLIFICACIÓN POR TÉCNICA RACE

Se seleccionaron cinco secuencias con alta homología a proteínas implicadas en la apoptosis mitocondrial, y una secuencia homóloga a una proteína relacionada con el proceso de fragmentación del ADN, a partir de la base de datos MytiBase (Venier y col. 2009). Las secuencias seleccionadas así como sus números de identificación correspondientes (IDs) se indican en la Tabla 1.

Secuencia	ID
<i>p53 tumor suppressor-like protein</i> (p53)	MGC02732
Proteína reguladora del daño al ADN y p53 (PDRP)	MGC08340
Proteína X asociada al Bcl-2 (Bax)	MGC09152
Proteína Bcl ₂ (Bcl ₂)	MGC03747
Inhibidor de Bax 1 (BI-1)	MGC00186
Factor de fragmentación del ADN 45 (DffA)	MGC03626

Tabla 1. Relación de secuencias seleccionadas de la base de datos MytiBase

Aquellas secuencias que estaban incompletas se finalizaron mediante la técnica de amplificación RACE, siguiendo el protocolo empleado en los anteriores capítulos. El software Primer3 (v. 0.4.0) (Rozen y Skaletsky, 2000) se utilizó para diseñar los cebadores RACE (Tabla 2).

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
p53-RACE 5´-2	GGGGAACCATGGATGACAGTTCCAA
p53-RACE 5´-3	TTGGTGACCCATTCTGAGCCAGCTT
p53-RACE3´-1	CACCAGGAGGCCAAAAGAGGAAAGCA
p53_F1	GAATACTCTGGGAGAGGTCACAC
p53_R1	TTCTGAGCCAGCTTGAGGTATC
p53_F2	AATGTCACAAGCTTCAGTTCAA
p53_R2	TAAGGTGGGGTGATGTGAT
Bcl-2-RACE5´-1	CCACAAATCCTTGCCAACCACCGTTA

Tabla 2. Secuencias de cebadores empleadas en la amplificación RACE

III.2.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FILOGENÉTICA

Para obtener las secuencias consenso de nucleótidos y llevar a cabo la traducción y posterior comparación de las proteínas por homología, se emplearon las mismas herramientas bioinformáticas que las utilizadas en el capítulo II. Asimismo, se realizó la búsqueda de motivos conservados dentro de los marcos de lectura completos (ORF) mediante el programa SMART7 (Letunic y col., 2012) así como la base de datos PROSITE (Sigrist y col., 2010). Se determinaron las regiones transmembrana y las señales de retención de la membrana del ER a través de la web TMPred y el programa PSORT II, respectivamente (Horton y Nakai, 1997). Mediante el servidor PredictProtein, PredictNLS y NetNES 1.1, se obtuvieron los sitios de unión al ADN, las señales de localización nuclear (NLS) y las señales de exportación nuclear (NES) (Cokol y col., 2000; Rost y col., 2003; La Cour y col., 2004). Los alineamientos de las secuencias analizadas, con aquellas similares obtenidas a partir de la base de datos de GenBank, al igual que la construcción de los árboles filogenéticos, se realizó de manera similar y siguiendo la metodología empleada en el capítulo II.

III.2.4 INDUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS EN HEMOCITOS DE MEJILLÓN

Se indujo el proceso apoptótico en hemocitos de mejillón a través del tratamiento con UV siguiendo el mismo protocolo que en el capítulo II. En todos los experimentos realizados se incluyó un grupo control, no expuesto a UV. Se llevó a cabo la evaluación de la apoptosis en los hemocitos irradiados empleando un microscopio confocal y la técnica de citometría de flujo. Por una parte, se determinaron los cambios morfológicos del núcleo y la condensación de la cromatina en hemocitos tratados con UV. Para ello, se extrajeron 500µl de hemolinfa a partir de individuos de mejillón y se repartió en cámaras de contaje. Después, se expusieron las células a UV y a las 3h y 24h post-irradiación, se tiñeron los hemocitos con el reactivo DAPI (Sigma-Aldrich Co. LLC.) previamente diluido en agua de mar filtrada (FSW) a una concentración de 0,1ng/µl, y se procedió a evaluar los cambios apoptóticos empleando un microscopio confocal TSC SPE (Leica). Tras la exposición de los hemocitos al UV, se midieron los niveles apoptóticos empleando un citómetro de flujo siguiendo los mismos pasos que en el capítulo II. Se cuantificó el número de células apoptóticas y necróticas empleando los reactivos annexina V-FITC y 7-amino-actinomicina (7-AAD), respectivamente.

III.2.5 IMPLICACIÓN DEL ROS EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LUZ ULTRAVIOLETA EN HEMOCITOS DE MEJILLÓN

III.2.5.1 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS ANTIOXIDANTES NAC Y PDTC

Antes de llevar a cabo los ensayos de inducción de ROS en presencia y ausencia de los compuestos antioxidantes NAC y PDTC, se seleccionó la concentración de estos reactivos a partir de ensayos de toxicidad realizados con cuatro diluciones seriadas de cada compuesto a las siguientes concentraciones: 0,1mM, 1mM, 10mM y 100mM para el NAC y, 5µM, 50µM y 500µM para el PDTC. Se emplearon siete pools de hemocitos extraídos de cuatro mejillones distintos. Después, la hemolinfa se transfirió a placas de 96 pocillos (BD) que fueron incubadas durante 30 minutos a una temperatura de 15°C con el fin de facilitar la adhesión celular. Una vez pasado el tiempo, se retiró el sobrenadante y las células se trataron con 100µl de cada uno de los antioxidantes

durante una hora a 15°C. Las muestras control se trataron con el mismo volumen de FSW. Tras el periodo de incubación, los sobrenadantes se descartaron y se añadió un volumen de 100µl de FSW a cada pocillo. Las placas se incubaron de nuevo a 15°C y posteriormente, se evaluó la toxicidad de los tratamientos a tiempos de 3h y 24h post-tratamiento por citometría de flujo. Las muestras se tiñeron con 2µl de 7-AAD (BD) y se dejaron durante 15 minutos en condiciones de oscuridad. Las placas fueron analizadas por citometría de flujo usando el software Cell Quest y la herramienta Plate Manager (BD Biosciences). El porcentaje de células no viables se registró en el canal FL-3.

III.2.5.2 PRODUCCIÓN DE ROS EN PRESENCIA DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

Se llevaron a cabo tres experimentos para confirmar que el UV induce la producción de ROS en hemocitos de mejillón. Para cada experimento se emplearon ocho muestras independientes formadas cada una de ellas, por pooles de hemocitos procedentes de tres animales distintos. Posteriormente, se distribuyó la hemolinfa en placas de 24 pocillos (BD), y éstas se incubaron a 15°C durante 30 minutos para favorecer la adhesión de las células al fondo de la placa. Después se lavaron con FSW y se trataron con UV durante 45 minutos. Asimismo, se incluyeron controles absolutos no irradiados y se mantuvieron en oscuridad. El resto de células se trató con un volumen de 1ml de dos compuestos antioxidantes: NAC y PDTC (Sigma-Aldrich), a concentraciones de 1mM y 50µM, respectivamente, durante una hora y previamente a la exposición de las células con UV. Inmediatamente después de la irradiación, se midió la producción de ROS empleando la sonda 2', 7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA) (Molecular Probes) mediante citometría de flujo. Tras la exposición a UV, se eliminó el medio (FSW) y se añadió la sonda diluida 1:1000 (en 0,4% dimetil-sulfóxido (DMSO) preparada en FSW). Las células se incubaron durante 10 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo, los hemocitos se lavaron dos veces y se resuspendieron en PBS. La sonda DCFH-DA difundió hacia el citoplasma donde se bloqueó e hidrolizó a la 2', 7'-diclorofluoresceína (DCFH). Tras la oxidación por la liberación de los radicales de oxígeno, la forma hidrolizada emitió fluorescencia y ésta fue detectada en el canal FL-1. Los hemocitos se lavaron dos veces y se resuspendieron en PBS. Se empleó el software Cell Quest (B&D) para determinar la

media de la fluorescencia de un número de 10.000 eventos en las regiones R1 y R2, correspondientes a los granulocitos e hialinocitos, respectivamente.

III.2.6 EFECTO DE LA LUZ ULTRAVIOLETA SOBRE LA MODULACIÓN DE LA MAQUINARIA CENTRAL APOPTÓTICA

III.2.6.1 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS INHIBIDORES Pft- α , CsA Y Z-VAD-FMK

Para la selección de la concentración óptima de los reactivos PFT- α , CsA y Z-VAD-FMK, se realizaron ensayos de evaluación de la toxicidad siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado III.2.5.1 y para los que se emplearon siete muestras biológicas de hemolinfa extraída de siete mejillones adultos diferentes cada uno. Se prepararon diferentes soluciones de stocks de la siguiente manera: el PFT- α se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) al igual que el Z-VAD-FMK, mientras que la CsA se disolvió en etanol; para preparar soluciones a las concentraciones que se especifican a continuación: 0,1mM, 1mM y 100mM de PFT- α ; 0,2 μ M, 2 μ M y 20 μ M de CsA y 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M de Z-VAD-FMK. A las 3h y 24h se analizó la viabilidad celular empleando 7-AAD por citometría tal y como se describió en el apartado anterior.

III.2.6.2 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE APOPTOSIS EN PRESENCIA DE LOS COMPUESTOS INHIBIDORES

Se emplearon cinco reactivos químicos para modular, bloquear o inhibir el proceso apoptótico inducido por UV en hemocitos. Se utilizaron los siguientes compuestos: NAC, PDTC, PFT- α , CsA y Z-VAD-FMK. Todos los reactivos empleados eran de la casa comercial Sigma (Sigma-Aldrich Co. LLC.). Los experimentos se llevaron a cabo tres veces. Para ello, se obtuvieron 20 muestras biológicas distintas de hemolinfa (cada una de las cuales se obtuvo a partir de cuatro mejillones distintos). La hemolinfa se repartió en placas y éstas se incubaron para facilitar la adhesión de los hemocitos durante 30 minutos a 15°C. Pasado ese tiempo, el sobrenadante se desechó, y se añadió 1ml de cada uno de los cinco reactivos inhibidores (de las concentraciones previamente seleccionadas como no tóxicas) a cada pocillo: NAC (1mM), PDTC (50 μ M), PFT- α (100 μ M), CsA (20 μ M) y Z-VAD-FMK (100 μ M). Se añadió agua de mar filtrada (FSW), en lugar de reactivo, a los pocillos con las muestras control. Las muestras se incubaron con los inhibidores a 15°C en oscuridad. Una hora

más tarde, el sobrenadante se desechó y se añadieron 150µl de FSW antes de proceder con la irradiación de los hemocitos, durante 45 minutos con UV, para evitar la deshidratación de las células. Las placas control se mantuvieron en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. A continuación, se retiró el sobrenadante y se añadió 1ml de FSW. Se analizaron los niveles de apoptosis después de 3h y 24h usando un citómetro de flujo tal y como se describió en el capítulo II. En el caso de las muestras tratadas con PFT- α , éstas también se analizaron a las 6h posteriores al tratamiento con UV.

III.2.6.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES APOPTÓTICOS USANDO PCR CUANTITATIVA

El análisis de la modulación génica se llevó a cabo con tres muestras biológicas independientes que consistieron en pools de hemocitos extraídos a partir de cuatro animales. Los pools de hemolinfa se distribuyeron en placas de 24 pocillos (BD) y se trataron con UV durante 45 minutos. Las células tratadas con PFT- α (100uM) o con FSW (controles) se muestrearon inmediatamente tras la irradiación (0h) y a las 3h, 6h, 24h y 48h post-irradiación. En cada uno de los puntos de muestreo se desecharon los sobrenadantes y se rascaron los hemocitos del fondo de los pocillos con un volumen de 500µL del reactivo Trizol (Invitrogen, USA). La extracción total de ARN y la síntesis de ADNc se llevaron a cabo según el protocolo desarrollado en los capítulos anteriores. Se diseñaron cebadores específicos de PCR cuantitativa con el software Primer3 (v. 0.4.0) teniendo en cuenta las restricciones de PCR cuantitativa ya conocidas (Tabla 3).

Se llevó a cabo el análisis de la eficiencia de los pares de cebadores siguiendo el protocolo descrito en el capítulo I. Los valores de eficiencia de los cebadores fueron los siguientes: -2,91 para p53, -3,11 para el PDRP, -3,19 para el Bax, -3,05 para el Bcl-2, -3,12 para el BI-1 y -3,17 para el DffA. Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado. Los datos del nivel umbral (Ct) se compararon a través del método comparativo Ct (Ct) (Livak y Schmittgen, 2001). Se utilizó la actina como gen de referencia. Se calcularon los niveles de expresión dividiendo los valores de expresión estandarizada en los hemocitos tratados con UV entre los valores de expresión normalizada en los controles.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador
<i>Muscel</i> p53-F	CTAGGTAGACGGGCAGTAGAAGTT
<i>Muscel</i> p53-R	GCCTCCTGGTGTACTGTAGTGAT
<i>Muscel</i> PDRP-F1	CTGCCAAAGAAAGCTACAAAGAAG
<i>Muscel</i> PDRP-R1	CCTTTGACAATGGATTGAGGTT
<i>Muscel</i> Bax-F2	CCAACAGGTCCACCATTAGAAC
<i>Muscel</i> Bax-R2	CTCTTGCCACAGTTAGGAATG
<i>Muscel</i> Bcl ₂ -F1	AGATAACGGTGGTTGGCAAG
<i>Muscel</i> Bcl ₂ -R1	TAACGCCATTGCGCCTAT
<i>Muscel</i> B11-F1	GGCCAGTTTTCTCACCTCCT
<i>Muscel</i> B11-R1	CCAATCCATGACTGGACCAA
<i>Muscel</i> Dff-F	GCTGCGTGTGTATAGCAGAG
<i>Muscel</i> Dff-R	CTTCACCTATGCCTTCAGGTCT
<i>Muscel</i> Actin-F	AACCGCCGCTTCTTCATCTTC
<i>Muscel</i> Actin-R	CCGTCTTGCTGGTGGA

Tabla 3. Secuencias de cebadores específicos usados para los ensayos de PCR cuantitativa

III.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar de las diferentes muestras biológicas y los datos fueron analizados usando el test-t de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

III.3 RESULTADOS

III.3.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FILOGENÉTICA

Se seleccionaron cinco genes diferentes de *M. galloprovincialis* implicados en el proceso apoptótico mediante la ruta de degradación de la mitocondria y la consecuente activación de la apoptosis. Los genes p53, PDRP, Bcl₂, Bax y BI-1 se clonaron y secuenciaron. Asimismo, también se seleccionó una secuencia con alta homología a la proteína DffA. En la Tabla 4 se detalla la longitud de las secuencias obtenidas, los ORFs y el tamaño de las secuencias de aminoácidos. Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización de la estructura y dominios de las secuencias.

Secuencia	p53	PDRP	Bcl ₂	Bax	BI-1	DffA
Tamaño total (pares de bases)	2.185	746	1.172	1.175	863	828
ORF	1.308	390	558	630	711	603
aa	435	129	185	209	236	200

Tabla 4. Tamaño de las secuencias descritas. Se indican el tamaño total en pares de bases, el tamaño del marco abierto de lectura (ORF), y el tamaño de las proteínas en número de aminoácidos (aa).

III.3.1.1 EL GEN p53

La secuencia de la proteína p53 de *M. galloprovincialis* presentó las mayores identidades con las proteínas p53 de otras especies de *Mytilus*: *M. edulis* y *M. trossulus* (identidad del 99% y 98%, respectivamente). El p53 de mejillón mediterráneo mostró una estructura típica de dominios similar a la descrita para otros bivalvos así como para el p53 de humanos (Figura 1), formada por los motivos TAD, FAM y TETRAMER. Además, todos los aminoácidos esenciales asociados al sitio de unión Mdm2 (F, L, W, L) y los tres sitios de fosforilación (Ser, Thr y Glu) se conservaron dentro del dominio TAD. Los dos dominios ricos en prolina (PxxP), también estuvieron presentes. Además,

la proteína p53 conservó cinco dominios de unión al ADN. Dentro del dominio tetramérico se identificó una señal de exportación nuclear (NES), entre los residuos 372 y 383. Los tres sitios de localización nuclear (NLS I, II y III) se situaron entre los residuos 349-354, 394-398 y 414-416, respectivamente (Figura 1).

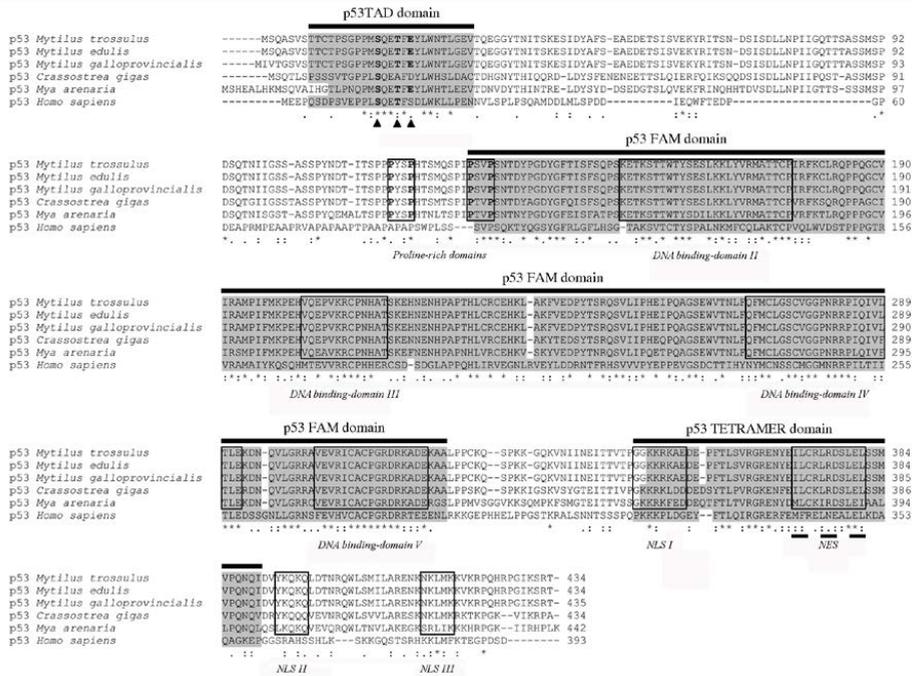


Figura 1. Caracterización estructural del p53. Los tres dominios de p53 (TAD, FAM y TETRAMER) aparecen sombreados. Los triángulos negros indican los sitios de fosforilación conservados. Los dos dominios conservados ricos en prolina (PxxP) se encuentran dentro de cuadros. Los cuatro dominios de unión al ADN II, III, IV y V incluidos en el dominio p53 FAM, también se indican dentro de cuadros. El dominio TETRAMER contiene la señal de exportación nuclear (NES). NLSI, NLSII y NLSIII, indican las tres señales de localización nuclear.

Se llevó a cabo un análisis filogenético incluyendo un total de 17 secuencias de p53 pertenecientes a los siguientes grupos de organismos: cordados, moluscos, cnidarios, artrópodos, nematodos y amebas. Todas las secuencias de p53 de moluscos se agruparon en la misma rama del árbol filogenético con un valor *bootstrap* del 100%. El análisis filogenético mostró que las secuencias de mejillón están más cerca de las de cordados que de otros invertebrados (81% del valor *bootstrap*) (Figura 2).

Se analizaron las relaciones filogenéticas del PDRP de *M. galloprovincialis* con proteínas similares descritas en otros organismos. La secuencia de mejillón se situó en la parte central del árbol, más próxima a las secuencias de organismos cordados que a otros invertebrados como los artrópodos, platelmintos, cnidarios y poríferos (Figura 4).

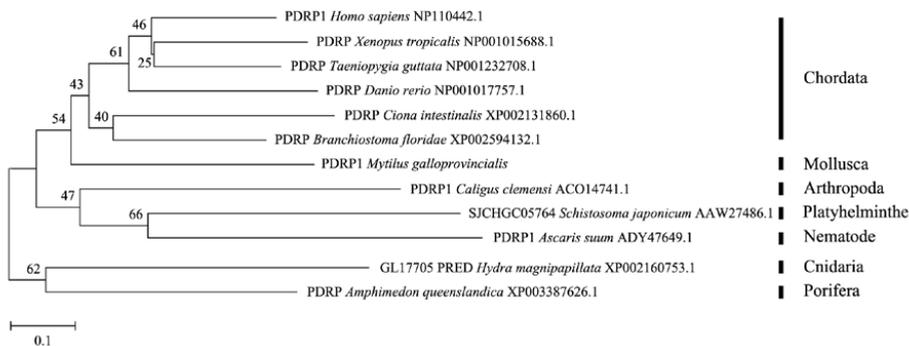


Figura 4. Árbol filogenético de la proteína PDRP de *M. galloprovincialis* con proteínas similares representativas de grupos taxonómicos. El árbol se llevó a cabo mediante la metodología Neighbor-joining (NJ). Los números situados en las ramas indican los valores *bootstrap*.

III.3.1.3 LA FAMILIA DE PROTEÍNAS Bcl-2

Se describieron dos miembros de la familia Bcl-2 en *M. galloprovincialis*, el Bcl₂ y la proteína Bax (Figura 5). La comparación de estas proteínas con aquellas de mayor similitud mostró que las identidades más elevadas correspondieron a las proteínas tipo Bcl₂ de *Saccoglossus kowalevskii* (E-value de 2e⁻⁵¹) y Bax de *Ictalurus punctatus* (E-value de 8e⁻³⁶), respectivamente. Se realizó un alineamiento múltiple pareado de las secuencias de aminoácidos incluyendo siete proteínas Bcl₂ y seis proteínas Bax disponibles en la base de datos cubriendo, de esta manera, el mayor número de grupos taxonómicos (Figura 5). Se predijo la posición del dominio Bcl para las dos proteínas, entre los aminoácidos 42 y 141. Además, se detectó la presencia de varios motivos BH y dominios transmembrana en la región C-terminal de estas proteínas. La proteína Bcl₂ conservó cuatro regiones BH (BH1-BH4) mientras que la proteína Bax sólo mostró tres regiones, y no conservó el motivo BH4 (Figura 5).

III. Identificación de genes implicados en el mecanismo apoptótico mitocondrial en *Mytilus galloprovincialis*

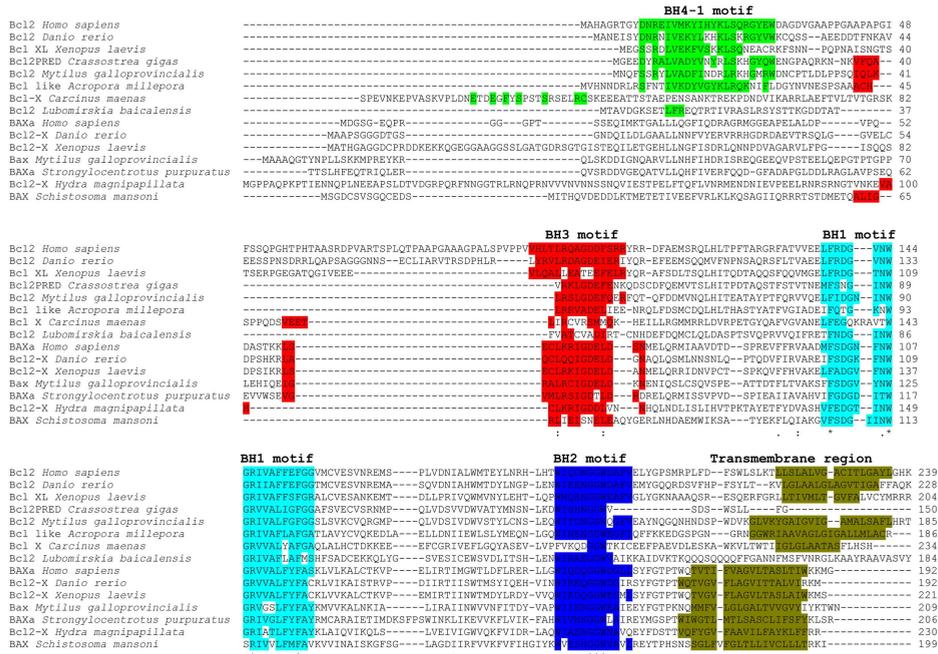


Figura 5. Caracterización estructural de la familia de proteínas Bcl-2. Se indican las cuatro regiones BH (BH1, BH2, BH3 y BH4) y el dominio transmembrana en diferentes colores.

Se construyó un árbol filogenético con 20 proteínas de la familia Bcl-2 agrupando al Bcl₂ y al Bax en dos grupos separados: grupo I y grupo II, respectivamente. El Bcl₂ de mejillón se localizó dentro del grupo I en la misma rama que la secuencia de ostra (*Crassostrea gigas*) (96% de valor *bootstrap*) (Figura 6). Las proteínas Bcl-2 de moluscos se situaron más cerca de los homólogos de vertebrados superiores que de otros invertebrados como artrópodos, cnidarios o esponjas. En el grupo II se observó una situación similar dado que la proteína Bax de mejillón se localizó más próxima a vertebrados que a otros invertebrados (Figura 6).

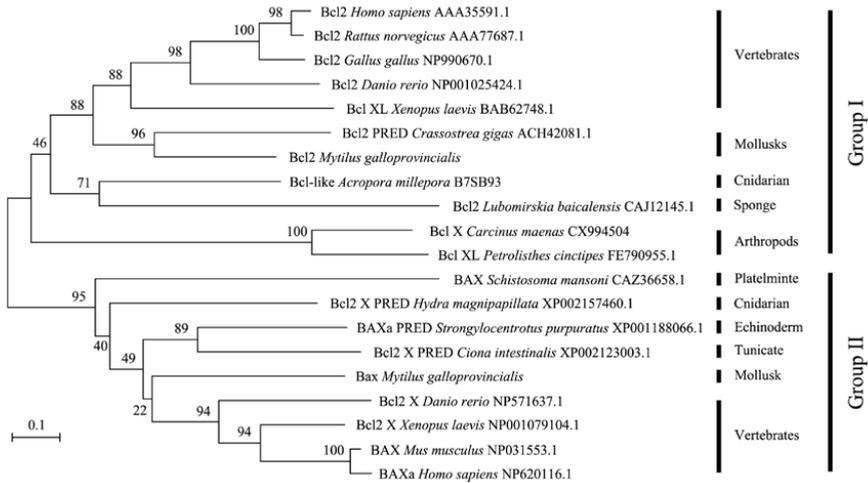


Figura 6. Árbol construido siguiendo la metodología Neighbor-joining (NJ) que muestra la relación filogenética de los diferentes miembros de la familia Bcl-2. Se incluyen los principales grupos taxonómicos incluyendo secuencias representativas de vertebrados e invertebrados. Los números de las ramas indican los valores *bootstrap*.

III.3.1.4 LA PROTEÍNA BI-1

La secuencia completa de BI-1 mostró la mayor homología con la proteína homóloga de salmón atlántico (*Salmo salar*) con un E-value de $1e^{-82}$. Las identidades obtenidas entre el BI-1 de mejillón y las secuencias alineadas fueron de: 47% con *Homo sapiens*, 33% con *D. melanogaster*, 48% con *H. magnipapillata*, 42% con *Schistosoma mansoni* y 26% con *Arabidopsis thaliana*. El BI-1 conservó un único motivo BaxI-1 entre los residuos 28 y 230, constituido por seis dominios transmembrana situados en las posiciones 33-55 (TM1), 59-76 (TM2), 88-110 (TM3), 115-137 (TM4), 144-166 (TM5) y 171-190 (TM6) (Figura 7). El motivo señal de BI-1 también estuvo presente, y cuya compleja estructura: (G-x(2)-[LIVM]-[GC]-P-x-[LI]-x(4)-[SAGDT]-x(4,6)-[LIVM](2)-x(2)-A-x(2)-[MG]-T-x-[LIVM]-x-F) se localizó entre los residuos 99 y 128 (Figura 7). Se predijeron dos señales de retención en los extremos N y C-terminal de la secuencia. La primera de ellas estuvo situada entre los residuos 2-5 (motivo tipo XXRR) y la segunda entre las posiciones 232-235 (motivo EKKK) dentro de la región C-terminal de la secuencia (Figura 7).

III. Identificación de genes implicados en el mecanismo apoptótico mitocondrial en *Mytilus galloprovincialis*

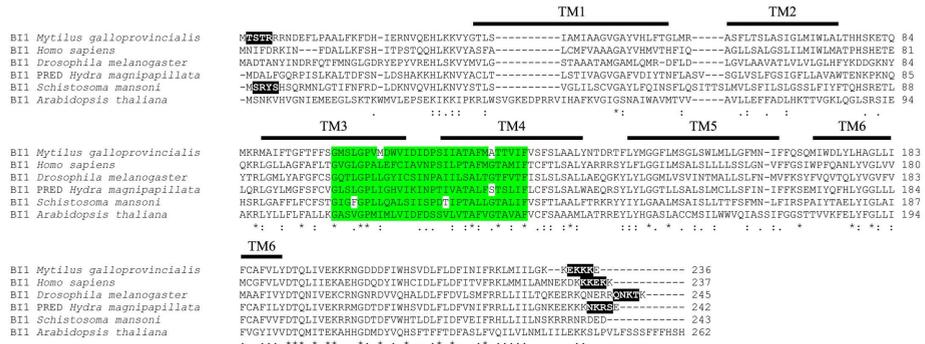


Figura 7. Alineamiento de los genes BI-1 de *M. galloprovincialis* con proteínas similares. El motivo señal de esta familia de proteínas está sombreado en color verde. Se señalan los seis dominios transmembrana. Las dos señales de retención de la membrana del retículo endoplasmático situadas en las regiones N-terminal y C-terminal están sombreadas en negro.

Se llevó a cabo la construcción de un análisis filogenético incluyendo representantes de los seis grupos diferentes de proteínas que contienen el motivo transmembrana Bax1-1 (TMBIM) (Figura 8).

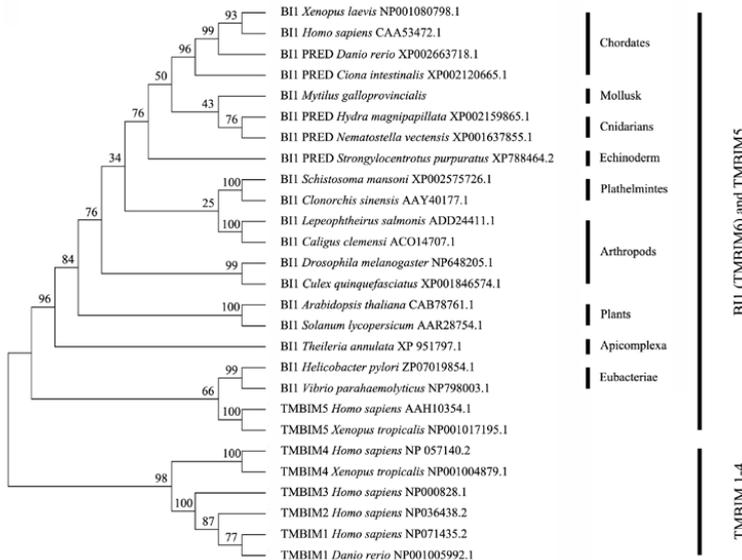


Figura 8. Árbol filogenético Neighbor-joining (NJ) que incluye los seis grupos de proteínas TMBIM. Aparecen los principales grupos taxonómicos, incluyendo secuencias de vertebrados e invertebrados. Los valores *bootstrap* se indican en las ramas.

agruparon en tres ramas principales con elevados valores de fiabilidad: una correspondiente a la familia CIDE (100%), una segunda rama con la familia DffA (97%) y la tercera con la familia DffB (99%). La secuencia DffA de mejillón se agrupó con proteínas similares de otros invertebrados, como los artrópodos y cnidarios; y sin embargo, se situó más lejos de cordados (valor de *bootstrap* del 80%) (Figura 10).

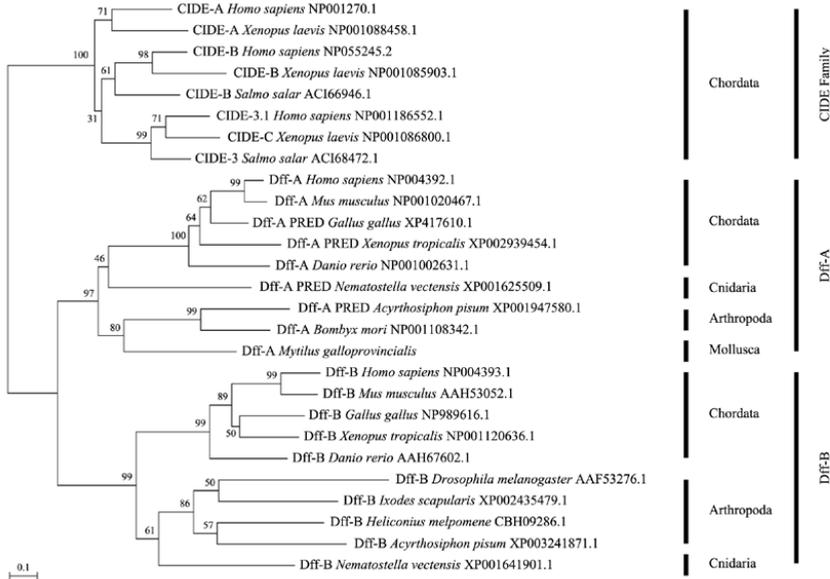


Figura 10. Árbol filogenético NJ (Neighbor-joining) construido con las secuencias de las proteínas DffA, DffB, CIDE-A y CIDE-B de invertebrados y vertebrados. Los números de las ramas representan los valores *bootstrap*.

III.3.2 INDUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS EN HEMOCITOS DE MEJILLÓN

La caracterización de estos genes facilitó la construcción de un esquema general sobre el mecanismo apoptótico en moluscos (Figura 11). La información que se incluye en el siguiente mapa apoptótico se basó en los genes caracterizados en el presente estudio y en ESTs relacionadas con la apoptosis obtenidas a partir de bases de datos genómicas y una extensa y minuciosa revisión bibliográfica.

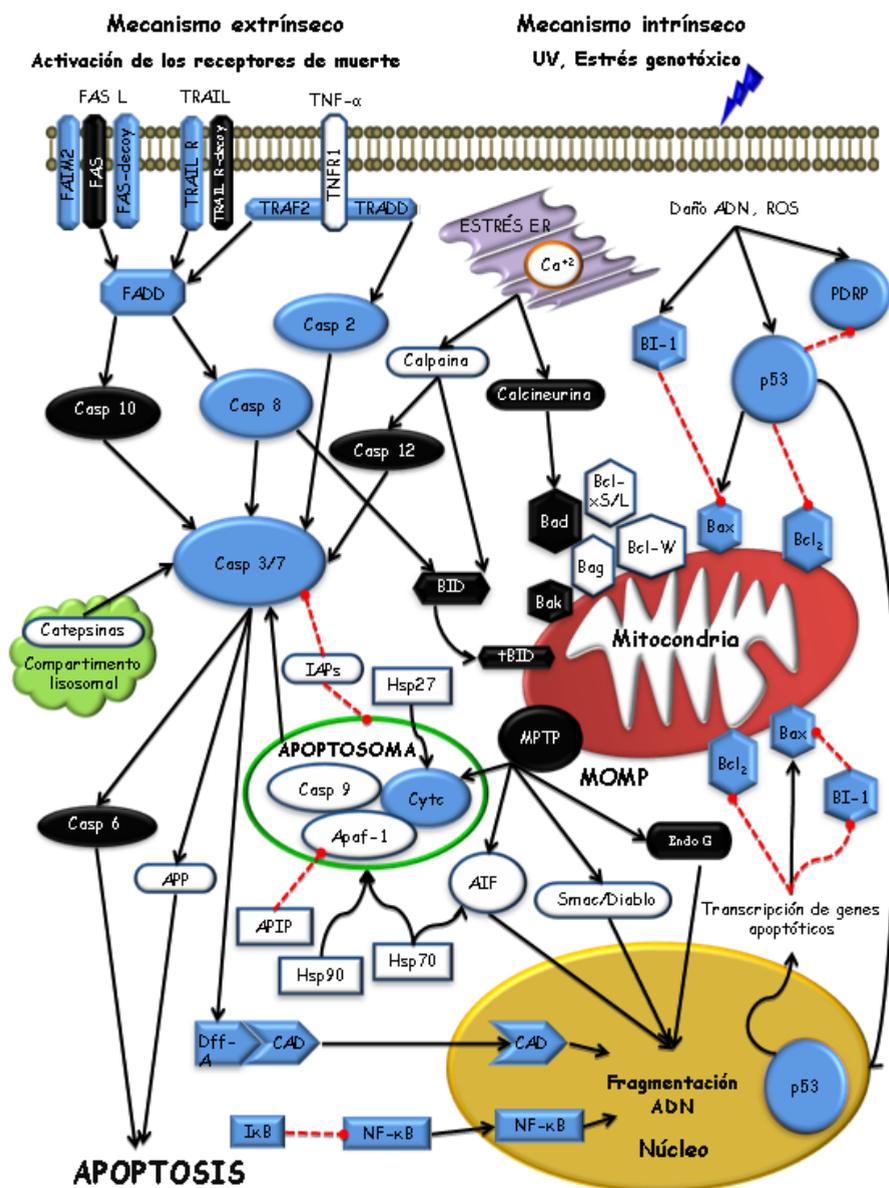


Figura 11. Esquema apoptótico de moluscos. Esquema que representa los principales mecanismos apoptóticos en moluscos. Los símbolos azules indican los genes descritos en bivalvos. Los símbolos blancos se refieren a las ESTs disponibles y los símbolos negros señalan aquellos genes que no han sido descrito todavía en moluscos. Las líneas de color rojo señalan inhibición.

Se confirma que los dos principales mecanismos apoptóticos descritos en vertebrados también están presentes en bivalvos. El mecanismo extrínseco se inicia a través de la activación de los receptores de muerte. Éstos, una vez activados reclutan a las moléculas FADD y rompen a la caspasa 8 activa, la cual a su vez activa a las caspasas efectoras. En el capítulo II se dejó constancia de la existencia de cuatro caspasas efectoras distintas en mejillón. Por otra parte, se han identificado varias IAPs en varias especies de bivalvos como almejas y ostras.

El mecanismo intrínseco se inicia a través de estímulos que inducen daño en el ADN como el UV. La actividad reguladora de las proteínas PDRP y BI-1, la participación del p53 y Bcl₂ en el MOMP y la liberación del citocromo C al citosol son características de este mecanismo. A pesar de que existe muy poca información relativa a los mecanismos apoptóticos que ocurren de manera independiente a las caspasas en bivalvos y la implicación del ER y los lisosomas en la apoptosis, se han identificado varias catepsinas y calpainas en almejas y mejillones.

Las caspasas ejecutoras inducen la fragmentación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos mediante la activación de las proteínas de la familia DFF y su posterior translocación al núcleo. El resultado de este proceso se observó claramente tras el tratamiento de los hemocitos de mejillón con UV (Figura 12). A las 3h de la exposición de las células al UV, se detectaron las típicas características de la condensación de la cromatina en el núcleo de algunas células irradiadas. Pasadas 24h, casi todas las células mostraron cambios apoptóticos. El núcleo presentó una morfología irregular y estuvo formado por un elevado número de fragmentos de cromatina condensada (Figura 12).

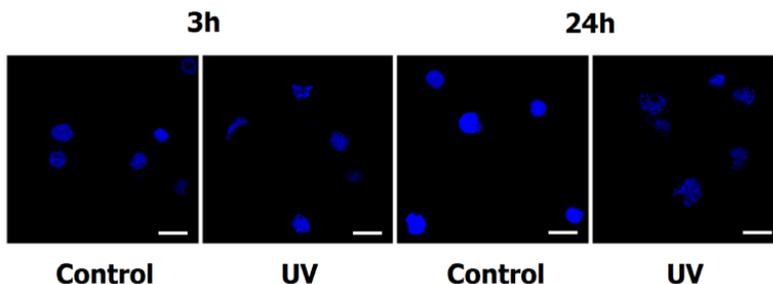


Figura 12. Evaluación de la morfología nuclear y condensación de la cromatina. Análisis por microscopía confocal de hemocitos de mejillón a las 3h y 24h tras el tratamiento de UV. Escala de 7,5 µm.

III.3.3 IMPLICACIÓN DEL ROS EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LUZ ULTRAVIOLETA EN HEMOCITOS DE MEJILLÓN

III.3.3.1 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS ANTIOXIDANTES NAC Y PDTC

Antes de comprobar la producción de ROS en hemocitos tras su estimulación con UV, se seleccionaron las concentraciones no tóxicas de antioxidantes. Se observó que a las 3h y 24h post-tratamiento, el porcentaje de células dañadas fue significativamente mayor en células tratadas con las concentraciones de 10mM y 100mM de NAC en comparación con el grupo control. Cuando los hemocitos se incubaron con PDTC, no se obtuvieron diferencias significativas independientemente de la concentración y el tiempo (Figura 13).

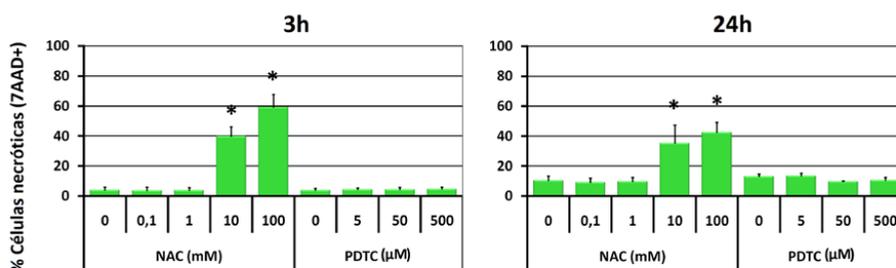


Figura 13. Selección de concentración de NAC y PDTC no tóxica. Se indica el porcentaje de células dañadas (7AAD+) a las 3h y a las 24h después del tratamiento con las diferentes concentraciones de reactivo. Los grupos control están representados por el valor 0. Los resultados se indican como la media \pm desviación estándar de siete muestras biológicas. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto a los controles ($p < 0,05$).

Dado que en el caso del NAC, los menores porcentajes de células dañadas se obtuvieron con las concentraciones de 0,1mM y 1mM; para la realización de los experimentos se optó por escoger aquella concentración (1mM), más comúnmente empleada en la bibliografía para este tipo de ensayos. En cuanto al PDTC, se eligió la concentración de 50µM por ser la que registró un menor porcentaje de células necróticas (Figura 13) además de situarse en el rango de concentraciones no tóxicas empleado en varios ensayos experimentales.

III.3.3.2 PRODUCCIÓN DE ROS EN PRESENCIA DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

El tratamiento con UV de los hemocitos de mejillón indujo la producción de ROS tanto en los granulocitos como en los hialinocitos (regiones R1 y R2, respectivamente) (Figura 14). A pesar de que un aumento significativo de la fluorescencia media se registró en ambos tipos celulares, los granulocitos mostraron niveles de fluorescencia diez veces más elevados que los valores observados en los hialinocitos (los niveles de fluorescencia media se extendieron desde 357 hasta 429 en hialinocitos y desde 2.519 a 3.154 en granulocitos). Además, el tratamiento con los antioxidantes NAC o PDTC antes del tratamiento con UV dio lugar a una reducción significativa de la producción de ROS en ambos tipos celulares (Figura 14).

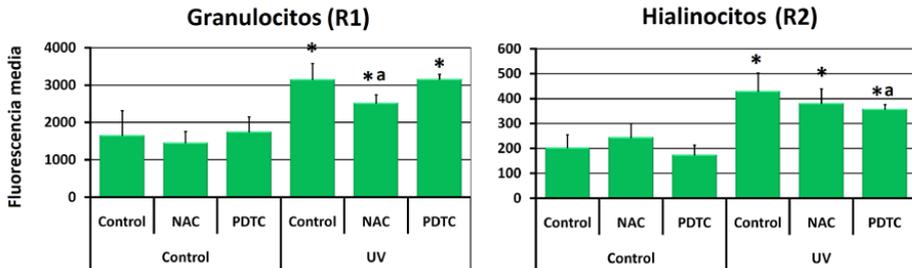


Figura 14. Cuantificación de la producción de ROS mediante la determinación de la media de la fluorescencia en granulocitos (región R1) e hialinocitos (región R2) inmediatamente después del tratamiento con UV. También se analizó el efecto de los antioxidantes NAC y PDTC antes de la inducción de la apoptosis. Los resultados se representan como la media \pm desviación estándar de ocho muestras biológicas.

III.3.3.3 EFECTO DE LOS ANTIOXIDANTES EN LOS NIVELES DE APOPTOSIS

El tratamiento con NAC y PDTC no indujo una reducción significativa de los niveles apoptóticos independientemente del tipo celular y tiempo de muestreo analizados e incluso, el tratamiento con NAC indujo un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas a las 3h post-irradiación alcanzando valores superiores al 80% (Figura 15).

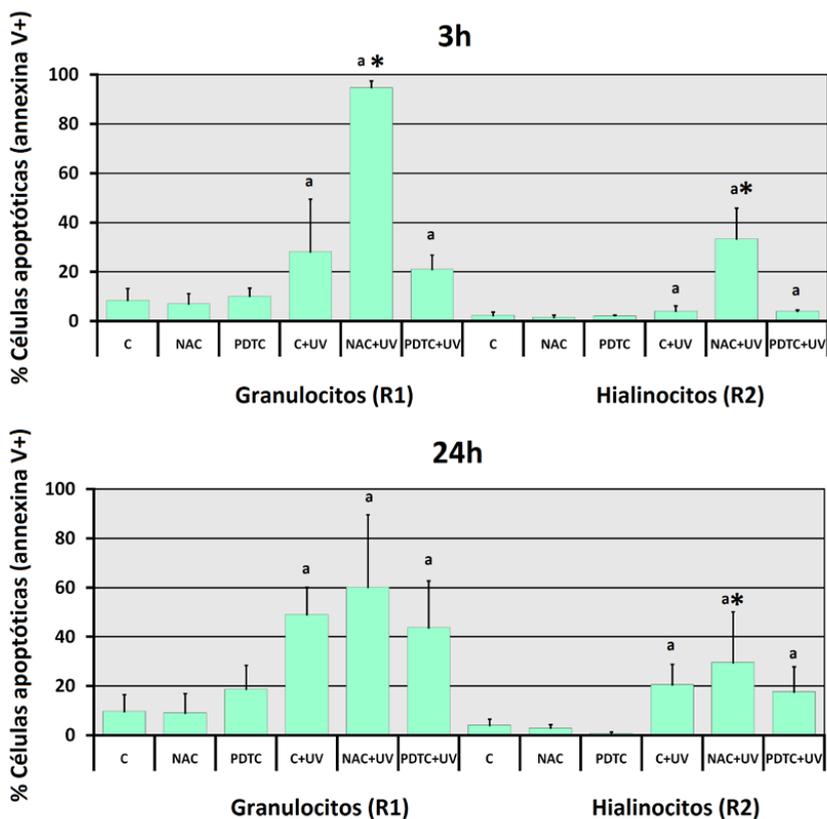


Figura 15. Modulación del proceso apoptótico mediante NAC y PDTC. Los resultados muestran el porcentaje de granulocitos (R1) e hialinocitos (R2) apoptóticos tratados con los antioxidantes a 3h y 24h tras la irradiación con UV. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de 20 muestras diferentes. (a) indica diferencias significativas entre células tratadas con UV y células no tratadas. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas tras el tratamiento con UV entre las células tratadas con NAC o PDTC y los hemocitos sin tratar.

III.3.4 EFECTO DE LA LUZ ULTRAVIOLETA SOBRE LA MODULACIÓN DE LA MAQUINARIA CENTRAL APOPTÓTICA

III.3.4.1 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS INHIBIDORES PFT-A, CSA Y Z-VAD-FMK

Se registraron diferentes niveles de toxicidad en las muestras tratadas con PFT-a en base a la concentración empleada (Figura 16). A las 3h post-tratamiento, se

registró el mayor número de células dañadas en aquellos hemocitos tratados con una concentración de 0,1 μ M mientras que los valores más bajos se registraron para concentraciones de 1 μ M y 100 μ M. A las 24h, el porcentaje de células necróticas no registró diferencias significativas en ninguna de las concentraciones analizadas (Figura 16).

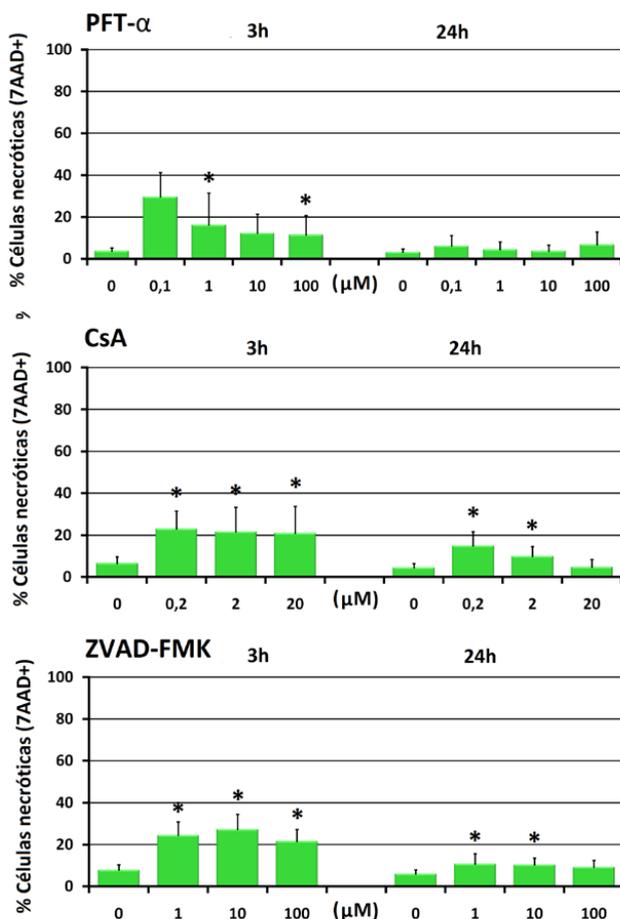


Figura 16. Selección de la concentración no tóxica de PFT- α , CsA y Z-VAD-FMK. Se representa el porcentaje de células dañadas (7AAD+) obtenido a las 3h y 24h tras el tratamiento con las diferentes concentraciones de los reactivos PFT- α , CsA y Z-VAD-FMK. Los grupos control están representados por el valor 0. Los resultados se indican como la media \pm desviación estándar de siete muestras biológicas. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto a los controles ($p < 0,05$).

La concentración seleccionada, para este reactivo, fue de 100 μ M ya que además de encontrarse entre las menos tóxicas, es una concentración que se sitúa dentro del rango de las usadas frecuentemente en diferentes modelos celulares (Zhang y col., 2003; Murphy y col., 2004).

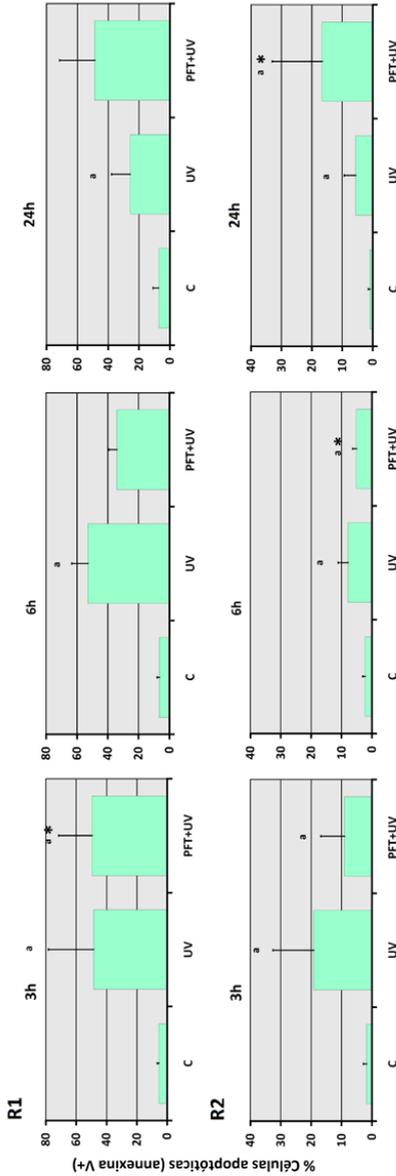
Se estudió la toxicidad de los reactivos CsA y Z-VAD-FMK (Figura 16). En ambos casos, se registraron porcentajes similares de células necróticas a las 3h, en todas las muestras independientemente de la concentración usada. Los tratamientos indujeron un aumento significativo en el número de células dañadas, abarcando desde el 20% al 23%. Sin embargo, a las 24h post-tratamiento, la concentración de 20 μ M, en el caso de la CsA, y, 100 μ M para el Z-VAD-FMK, fueron las menos tóxicas y, por tanto, las seleccionadas para llevar a cabo los experimentos.

III.3.4.2 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE APOPTOSIS EN PRESENCIA DE LOS COMPUESTOS INHIBIDORES

El tratamiento con el inhibidor PFT- α indujo una disminución significativa en los niveles apoptóticos. La reducción se observó en los granulocitos e hialinocitos a las 3h y 6h tras el tratamiento con UV, respectivamente, en comparación con los valores registrados en las células control irradiadas. En hialinocitos el nivel de apoptosis disminuyó desde el 19% al 9% mientras que en granulocitos, pasó de un porcentaje del 52% al 34%. A las 24h no se registró ninguna reducción de los niveles apoptóticos (Figura 17).

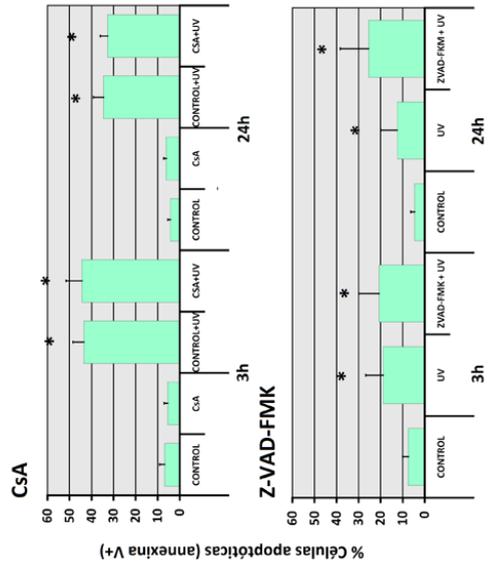
El tratamiento de hemocitos de mejillón con el estabilizador de membrana CsA y el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK (Figura 18), no produjo ningún efecto significativo en el porcentaje de células apoptóticas en comparación con los niveles registrados en hemocitos sin tratar, a las 3h y 24h tras el tratamiento con UV.

Figura 17. Modulación del proceso apoptótico por PFT- α . Porcentaje de granulocitos apoptóticos (R1) e hialinocitos (R2) tratados con PFT- α a las 3h, 6h y 24h, tras la radiación con UV. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de doce réplicas biológicas.



(a) indica diferencias significativas respecto a las muestras control ($p < 0.05$). (*) Indican diferencias significativas respecto a muestras tratadas con UV para ($p < 0.05$).

Figura 18. Modulación del proceso apoptótico en presencia de compuestos inhibidores. Porcentaje de hemocitos apoptóticos tratados con CsA y Z-VAD-FMK a las 3h y 24h post-irradiación. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de doce réplicas biológicas. Los asteriscos (*) señalan las diferencias significativas en relación a las muestras control no irradiadas ($p < 0.05$).



III.3.4.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES APOPTÓTICOS USANDO PCR CUANTITATIVA

Con el objeto de comprender los mecanismos moleculares bajo los cuales tiene lugar la reducción de los niveles de apoptosis tras el tratamiento con PFT- α , se analizó la expresión de los genes apoptóticos seleccionados previamente, mediante PCR cuantitativa. Los resultados obtenidos revelaron que el PFT- α es capaz de modular, disminuir y retrasar la expresión de los diferentes genes estudiados (Figura 19).

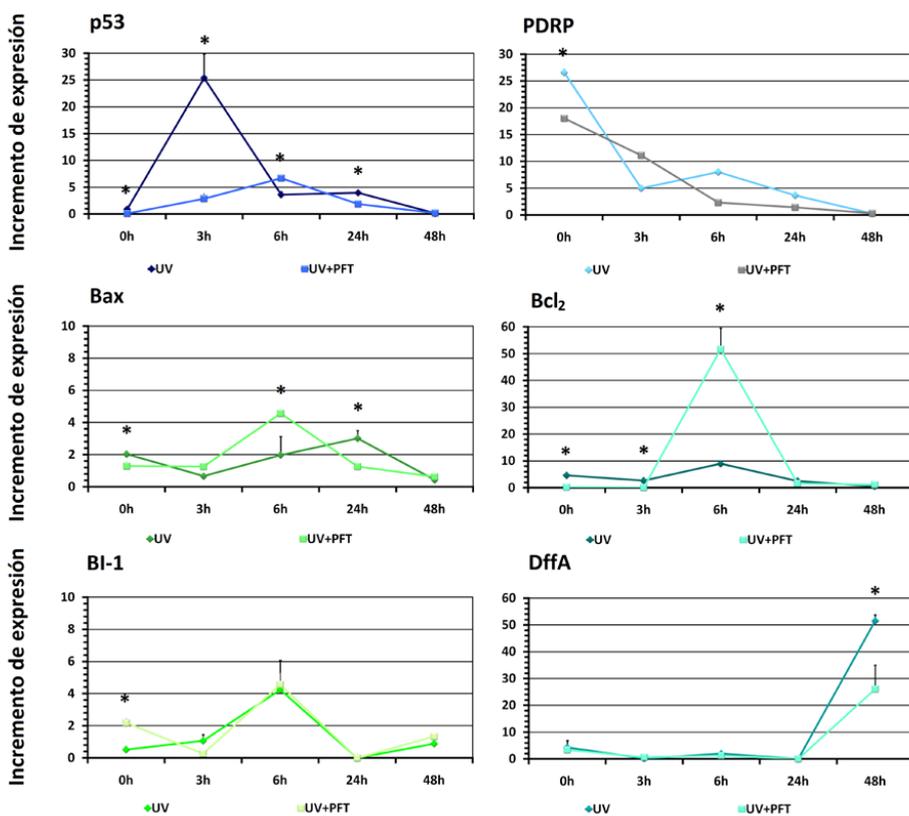


Figura 19. Expresión génica del p53, Bax, Bcl₂, PDRP, BI-1 y Dffa en hemocitos tratados con PFT- α a las 0h, 3h, 6h, 24h, y 48h tras la irradiación de UV. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de los tres pools empleados en los experimentos. Los asteriscos (*) señalan las diferencias significativas respecto del nivel de expresión obtenido en células no tratadas en cada punto de muestreo ($p < 0,05$).

El gen p53 se expresó de manera elevada tras la exposición al UV. Las células irradiadas mostraron el máximo nivel de expresión (superior a las 25 veces respecto a las células control), a las 3h post-irradiación. Hacia el final del experimento, la expresión se redujo hasta alcanzar niveles basales, y el tratamiento con PFT- α , modificó esta cinética. A las 3h, el valor de expresión en las células tratadas con el reactivo, fue tan solo de 2 unidades respecto al control. El nivel de expresión máximo se retrasó hasta las 6h post-irradiación (sólo 6 veces más que el nivel control) en aquellas células tratadas con PFT- α (Figura 19).

El gen PDRP también estuvo influenciado por el tratamiento con PFT- α . Las células control irradiadas mostraron los mayores niveles de expresión a los 45 minutos post-irradiación (tiempo de muestreo 0h), alcanzando valores de 27 veces por encima del nivel control. El tratamiento con PFT- α provocó una disminución significativa en este punto, reduciendo la expresión hasta un valor de 18 veces sobre el control. A partir de aquí, los niveles de expresión disminuyeron hasta las 48h sin que se detectasen diferencias significativas (Figura 19).

El tratamiento con PFT- α reguló de manera positiva y significativa la expresión de los genes anti-apoptóticos BI-1 y Bcl₂ a las 0h y 6h post-tratamiento, respectivamente. Los niveles de expresión observados en el gen BI-1 fueron bajos (tan solo 2 veces más que en el control a las 0h post-irradiación), y la expresión de Bcl₂ alcanzó valores significativos de más de 36 veces por encima del control a las 6h post-tratamiento. El tratamiento con PFT- α no afectó a la cinética de expresión del BI-1, y los niveles de expresión aumentaron hasta alcanzar niveles máximos a las 6h post-irradiación (4 veces más que la expresión del control) y disminuyó de forma gradual hasta situarse en niveles basales a las 48h (Figura 19).

El gen pro-apoptótico Bax también se moduló tras el tratamiento con PFT- α . Las células tratadas con este reactivo alcanzaron los valores significativos más elevados (4,5 veces más que en el control) a las 6h post-irradiación, mientras que las células no tratadas alcanzaron valores significativos a las 24h post-exposición a UV (2 veces más que en el control). A las 48h no se observaron diferencias significativas (Figura 19). Por último, la expresión del gen DffA, dado su carácter de marcador de los últimos estadios de la apoptosis, mostró una regulación positiva a las 48h post-irradiación y el tratamiento con PFT- α indujo una reducción significativa de la expresión pasando de un valor de 52 a 26 veces respecto al control (Figura 19).

III.4 DISCUSIÓN

En el presente capítulo, se caracterizaron seis nuevos genes apoptóticos en el mejillón *M. galloprovincialis* con el objetivo de determinar los mecanismos moleculares que median la ruta apoptótica mitocondrial en moluscos bivalvos así como identificar nuevos genes candidatos con una posible función como biomarcadores de contaminación.

El gen p53 es un punto de conexión entre varios mecanismos de respuesta al estrés y que gobierna la decisión entre la supervivencia celular y la apoptosis (Oren, 2003). En mejillones, este gen mostró características similares a los homólogos descritos previamente en humanos y en otros moluscos bivalvos (Walker y Levine, 1996; Walker y col., 2011). La presencia de dominios de unión al ADN, la región rica en prolina, el sitio de unión Mdm2, las NLS y NES; sugiere la implicación de este gen en mecanismos de activación y regulación transcripcionales y no transcripcionales, de manera similar a lo que ocurre en vertebrados (Haupt y col., 2003; Speidel, 2009).

El gen PDRP es un gen diana situado por debajo del p53, en la cascada apoptótica (Luo y col., 2003), no descrito de manera formal en invertebrados. El análisis llevado a cabo en este capítulo mostró como la proteína de mejillón conservó un motivo Prefoldin 2, que está también presente en cordados y algunos invertebrados; como esponjas y cnidarios. A pesar de que no se conoce la función del PDRP en el proceso apoptótico, varios autores han revelado que esta proteína participa en interacciones proteína-proteína y proteína-ADN (Luo y col., 2003).

Los genes Bcl₂ y Bax de mejillón, considerados como reguladores clave de la maquinaria de suicidio celular, conservaron los dominios BH característicos, y las regiones transmembrana (Cory y Adams, 2002; Igaki y Miura, 2004).

El nuevo BI-1 de mejillón contuvo los seis dominios transmembrana y un motivo señal típico al igual que el homólogo de humanos (Xu y Reed, 1998). Además, también estuvieron presentes las dos señales de retención del ER lo que sugirió una localización potencial del BI-1 dentro de este orgánulo celular, y donde el gen podría ejercer su actividad anti-apoptótica tal y como ha sido descrito en vertebrados (Xu y Reed 1998; Robinson y col., 2011).

El último de los genes, el DffA, funciona en los estadios tardíos de la apoptosis, induciendo condensación de la cromatina y rotura del ADN (Widlak y Garrard, 2009). La proteína DffA de mejillón conservó el motivo señal típico de esta familia de proteínas, el cual distingue al DffA de la familia de proteínas CIDE (Wu y col., 2008).

El análisis filogenético reveló que los componentes del mecanismo apoptótico mitocondrial en *M. galloprovincialis* son más similares a los de vertebrados que a los de invertebrados. El hecho de que los genes apoptóticos de invertebrados estén posicionados filogenéticamente más próximos a las secuencias de vertebrados, ya había sido reflejado en varios trabajos que centraban su atención en el estudio del p53 donde además, se establecía una separación entre los grupos de moluscos, cordados y otros animales como tunicados, equinodermos y artrópodos (Muttray y col., 2005, Štifanić y col., 2009; Walker y col. 2011). Asimismo, otros autores han confirmado que los diferentes componentes de la familia de proteínas Bcl-2 de cnidarios están más próximos a las secuencias de vertebrados que a las de invertebrados (Dunn y col., 2006). En el análisis llevado a cabo en este trabajo también se detectó una divergencia y posición filogenética similar, de las secuencias de mejillón, no sólo para el p53 o BI-1, genes bien representados en todos los grupos taxonómicos, sino también para el gen PDRP y miembros de la familia Bcl-2. Éstos, poseen un pequeño número de secuencias de invertebrados disponibles por lo que el grado de confianza del análisis filogenético llevado a cabo, no fue tan elevado. Esta situación refleja potencialmente el diferente grado de divergencia en los genes apoptóticos mitocondriales de los diferentes phyla animales (Gamulin y col., 2000), ya que el proceso apoptótico mitocondrial surgió antes de la aparición de los deuteróstomos, y parte o la totalidad del proceso se perdió en algunos grupos taxonómicos (Oberst y col., 2008; Bender y col., 2012). Por otra parte, el gen DffA de mejillón, el cual no está exclusivamente asociado con el mecanismo intrínseco, estuvo más próximo a las secuencias homólogas de cnidarios o insectos, que a las de vertebrados puesto que este gen no ha sido descrito en urocordados, equinodermos o nematodos (Eckhart y col., 2007).

La representación del entramado apoptótico de moluscos incluyendo las ESTs y los genes descritos en bivalvos, indica que la apoptosis en este grupo posee una complejidad similar a la de vertebrados. La apoptosis en moluscos actúa a través de los mecanismos extrínseco e intrínseco (Kiss, 2010). Una modalidad de los receptores de muerte, el dominio de muerte asociado al Fas (FADD) y la caspasa 8, son genes que se han descrito en moluscos (Moreira y col., 2012b; Philipp y col., 2012).

La asociación entre los mecanismos extrínseco e intrínseco en vertebrados, está mediada a través del gen Bid, una proteína perteneciente a la familia *BH3-only* la cual activa indirectamente las caspasas ejecutoras (Shibue y Taniguchi, 2006). Hasta la fecha no se han encontrado secuencias homólogas de esta proteína en bivalvos. Sin embargo, Moreira y col., (2012b) encontraron mediante el uso de técnicas de

secuenciación de alto rendimiento, una secuencia homóloga al gen ITBM2s, un gen muy poco estudiado en mamíferos que pertenecería a la familia de proteínas *BH3-only* (Fleischer y Rebollo, 2004) al igual que el Bid. El hecho de que estos genes no hayan aparecido en otros trabajos que emplean técnicas similares de secuenciación en bivalvos (Philipp y col., 2012) y su ausencia en la base de datos MytiBase (Venier y col., 2009), sugiere la existencia de asociaciones alternativas entre los mecanismos intrínseco y extrínseco en bivalvos.

Cabe destacar que el Apaf-1 y los genes caspasa 9 no han sido descritos de manera formal en moluscos bivalvos y sólo existen secuencias anotadas de manera automática en ostras y almejas (*R. philippinarum*) (Zhang y col., 2011; Moreira y col., 2012b).

En el presente estudio, se empleó el UV con el propósito de inducir apoptosis en hemocitos de mejillón. En primer lugar, se determinó si la radiación UV aumenta la producción de ROS en hemocitos de mejillón de modo similar al descrito en mamíferos (Kulms y col., 2002). En mejillones, el tratamiento con UV indujo la producción de ROS en hemocitos. La citometría de flujo reveló que los granulocitos son los más activos, mientras que los hialinocitos, aunque también mostraron un cierto nivel de actividad oxidativa, ésta fue mucho menor. A pesar de que varios autores revelaron la existencia de diferencias en la producción de ROS entre los distintos tipos celulares de algunos bivalvos como ostras (Lambert y col., 2007; Donaghy y col., 2009) o almejas (Prado-Álvarez y col., 2012), este es el primer trabajo que confirma la producción de ROS en hemocitos de mejillón tras la irradiación con UV.

La generación de ROS está implicada en la oxidación del poro mitocondrial, paso que conduce a la liberación del citocromo C (Simon y col., 2000). Con el objetivo de determinar si el ROS está involucrado en la apoptosis inducida por UV, se llevó a cabo la estimación del efecto de los antioxidantes NAC y PDTC. El tratamiento de los hemocitos con estos dos antioxidantes no afectó a los niveles de apoptosis a pesar de que tanto el NAC como el PDTC están involucrados en la reducción de la apoptosis en células HeLa tratadas con UV (Kulms y col., 2002). Estos resultados sugieren que el ROS no parece estar directamente implicado en el proceso apoptótico inducido por UV en bivalvos, aunque no se puede descartar que la luz UV induzca daños severos en las células imposibles de controlar mediante los tratamientos con antioxidantes.

El análisis de la expresión de genes apoptóticos usando PCR cuantitativa reveló que los genes caracterizados sufrieron modulación tras la exposición al UV. El gen p53, considerado como el principal mediador de la respuesta al estrés inducida por UV

(Kulms y Schwarz, 2000), se expresó de manera elevada en hemocitos a las 3h post-irradiación. Cabe mencionar que se esperaba obtener una respuesta, por parte del p53, de estas características puesto que el UV es capaz de inducir la expresión del p53 de manera dosis dependiente (Li y Ho, 1998). A pesar de que se ha identificado un nuevo papel no transcripcional para el p53 en la apoptosis de moluscos (Böttger y col., 2008; Walker y col., 2011), este gen también funciona como un factor de transcripción tras su translocación al núcleo, con el fin de regular la expresión de genes diana situados corriente apoptótica abajo (Haupt y col., 2003). Ejemplo de ello, es el PDRP (Luo y col., 2003). Se trata de un gen de respuesta temprana en hemocitos de mejillón, células en las que se detectó el mayor nivel de expresión a las 0h, momento en el que el p53 no estaba expresado. El tratamiento con UV desencadenó una regulación positiva del PDRP de manera independiente al p53. Sin embargo, a las 3h, este gen sufrió una regulación negativa mientras que el p53 alcanzó su máximo nivel de expresión. La modulación del PDRP, inducida por el gen p53, fue acorde con resultados previos obtenidos en humanos (Luo y col., 2003). En el modelo animal estudiado en este trabajo, el gen p53 también indujo la regulación positiva del gen pro-apoptótico Bax a las 24h post-exposición y simultáneamente, fue capaz de reprimir la transcripción de los genes anti-apoptóticos Bcl₂ y BI-1. Este comportamiento ya había sido observado anteriormente en trabajos llevados a cabo en mamíferos (Haupt y col., 2003; Vousden y Prives, 2009). Tal y como estaba previsto, el gen Dffa, se reguló de manera positiva en el último punto de muestreo (48h post-exposición) ya que este gen induce la rotura del ADN (Widlak y Garrard, 2009) la cual, como ya se explicó anteriormente, ocurre en la fase tardía de la apoptosis.

En base a los resultados obtenidos en el análisis de expresión génica, cabe la posibilidad de que exista una transcripción mediada por un mecanismo independiente al p53 en bivalvos, a pesar de que los procesos exactos bajo los que se produce la modulación de los genes PDRP, Bax, Bcl₂ y BI-1 en moluscos no se conozcan. En mamíferos, este mecanismo es inducido a través de la acumulación del p53 en el citosol o mitocondria y la activación directa de la proteína Bax (Chipuk y col., 2004).

Para estudiar la contribución relativa de la radiación UV y el p53 a la muerte celular programada mitocondrial, se analizaron el nivel de apoptosis y la expresión génica, en presencia del PFT- α , un compuesto químico que bloquea de manera selectiva la transactivación potencial del p53 y los genes situados por debajo de él, en la cascada apoptótica de una gran variedad de tipos celulares (Proietti De Santis y col., 2003; Liu y col., 2006). El tratamiento con PFT- α en hemocitos de mejillón redujo los

niveles de apoptosis en periodos de tiempo cortos tras la exposición al UV, sin embargo, no se observó ningún efecto inhibitorio a las 24h. Una respuesta similar se observó en las células CS-B humanas, donde el PFT- α no ejerció ningún efecto a tiempos largos tras el tratamiento con UV (Proietti De Santis y col., 2003), sugiriendo que los mecanismos transcripcionales son más significativos a tiempos cortos y los no transcripcionales son relevantes a tiempos largos, a pesar de que el efecto del PFT- α sobre la inducción de la apoptosis en un tipo celular particular es altamente dependiente de la importancia relativa de los genes pro y anti-apoptóticos inducidos a través del p53 (Steele y col., 2011). El tratamiento de hemocitos con PFT- α dio lugar no sólo a la regulación negativa del p53 y del PDRP a las 3h post-irradiación, sino también a la regulación positiva de los genes Bax y Bcl₂ a las 6h sugiriendo la participación de estos genes en mecanismos no transcripcionales que ocurren a las 6h. Varios autores han revelado que el aumento significativo en la expresión de Bcl₂ puede ocurrir en respuesta al efecto pro-apoptótico de Bax (Chipuk y col., 2010).

La supresión de la respuesta del gen Dffa en presencia del PFT- α a las 48h, sugirió que la expresión de dicho gen es dependiente de la transactivación potencial del gen p53. Para analizar la implicación de MOMP en la apoptosis inducida por luz UV en hemocitos de mejillón, las células fueron tratadas con CsA, compuesto que bloquea el MPT e inhibe la apoptosis en una amplia variedad de tipos celulares (Walter y col., 1998; Raymond y col., 2003). En hemocitos de mejillón, el tratamiento con CsA no ejerció ningún efecto sustancial sobre la apoptosis. La hipótesis más factible de esta respuesta, tal y como ya fue propuesto anteriormente en otros trabajos desarrollados en invertebrados modelo, podría ser que la despolarización de la membrana no fuese necesaria para que tuviese lugar la liberación de los factores pro-apoptóticos hacia el citosol (Tittel y Steller, 2000; Sokolova y col., 2004; Oberst y col., 2008).

La mitocondria controla el proceso apoptótico a través de la activación de caspasas y también mediante mecanismos independientes de estos genes (Pradelli y col., 2010). Con el propósito de analizar la actividad de las caspasas dentro del mecanismo apoptótico intrínseco de mejillón, se trataron hemocitos de mejillón con el inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK. Los resultados demostraron que este compuesto no fue capaz de inhibir la muerte celular, a diferencia de lo observado en otros moluscos bivalvos donde se comprobó que el Z-VAD-FMK inhibió la apoptosis inducida por noradrelina en hemocitos de *C. gigas* (Lacoste y col., 2002). Este resultado sugiere que diferentes estreses genotóxicos pueden desencadenar mecanismos moleculares apoptóticos diversos incluso en organismos similares. La

carencia de un efecto significativo de este compuesto sobre la apoptosis ya fue investigado, y se sugirió que en esos casos la muerte celular podría estar controlada por mecanismos independientes de las caspasas (Kim y col., 2001; Murahashi y col., 2003).

A pesar de la gran complejidad del mecanismo apoptótico intrínseco, el presente estudio aporta información novedosa sobre los mecanismos moleculares que median la muerte celular apoptótica en bivalvos. Los resultados de este estudio ponen de manifiesto que la PCR cuantitativa es una técnica muy precisa para determinar el efecto de los agentes genotóxicos sobre los organismos marinos y que los genes clave aquí descritos podrían servir como herramientas bioindicadoras del estrés ambiental.

CONCLUSIONES GENERALES

I. Las secuencias de los genes que codifican para las proteínas ApelB y ApelP carecen de dominios conservados y son estructuralmente muy similares a las proteínas tipo apextrina; proteínas pertenecientes al grupo de la familia MACPF cuyos integrantes contienen dominios complejos y una función de ataque a la membrana. ApelB y ApelP podrían representar miembros más primitivos dentro de este grupo de proteínas

II. El gen Macp es estructuralmente diferente a ApelB y ApelP. Presenta características comunes a los miembros ya descritos incluidos dentro de la familia MACPF y además posee varios dominios conservados

III. ApelB, ApelP y Macp se sobre-expresan de manera específica durante los estadios de desarrollo larvario de mejillón. ApelB y ApelP se expresan activamente durante las primeras horas de vida larvaria mientras que Macp está implicado en estadios de desarrollo más avanzados

IV. La regulación positiva de ApelB, ApelP y Macp en larvas infectadas con bacterias o estimuladas con patrones moleculares asociados a patógenos, pone de manifiesto su papel inmunológico y por tanto su participación en la respuesta inmune del mejillón mediterráneo

V. La presencia de al menos, dos caspasas iniciadoras y cuatro caspasas ejecutoras, distintas en mejillón, evidencia la funcionalidad e importancia del proceso efector apoptótico en estos organismos. Las caspasas caracterizadas podrían presentar una especialización funcional ya que responden de distinta manera a estímulos diferentes como la luz ultravioleta, bacterias, PAMPs o contaminantes

VI. La luz ultravioleta induce la producción de ROS en hemocitos de mejillón. Los hialinocitos presentan mayor disposición a sufrir apoptosis y de manera más rápida que los granulocitos, siendo éstos últimos los que alcanzan niveles de ROS más elevados

VII. La luz ultravioleta induce el proceso apoptótico en hemocitos de mejillón acompañado de todas las alteraciones morfológicas celulares típicas

VIII. La descripción de seis genes pertenecientes a familias proteicas diferentes en mejillón e implicados en procesos de apoptosis mitocondrial, sugiere la existencia de un mecanismo intrínseco en moluscos próximo en complejidad, al de vertebrados

IX. El tratamiento de hemocitos de mejillón, antes de ser expuestos a la luz ultravioleta, con el reactivo pifithrin-alpha evidencia que la apoptosis mitocondrial en moluscos bivalvos está mediada por mecanismos transcripcionales y no transcripcionales dependientes del p53

X. Los genes apoptóticos mitocondriales caracterizados, se modulan mostrando cinéticas diferentes frente a un único estímulo ambiental como es la luz ultravioleta

XI. El estudio de la apoptosis, mediante citometría de flujo y la expresión de genes, a través de PCR cuantitativa son métodos precisos y sensibles en comparación con las metodologías usadas tradicionalmente y podrían servir como biomarcadores generales de contaminación

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abello, P.A., Fidler, S.A., Bulkley, G.B., Buchman, T.G. (1994) Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death (apoptosis) by endotoxin. *Arch Surg* **129**(2): 134-141
- Abollo, E., Ramilo, A., Casas, S.M., Comesaña, P., Cao, A., Carballal, M.J., Villalba, A. (2008) First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. *Aquaculture* **274**: 201-207
- Aggarwal, S., Takada, Y., Singh, S., Myers, J.N., Aggarwal, B.B. (2004) Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. *Int J Cancer* **111**(5): 679-692
- Allen, H.L., y Deepe, G.S.J. (2005) Apoptosis modulates protective immunity to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. *J Clin Invest* **115**: 2875-2885
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**(2): 171
- Anderson, R.S. (1981) Inducible haemolytic activity in *Mercenaria mercenaria* hemolymph. *Dev Comp Immunol* **5**: 575-585
- Andreeva-Kovalevskaya, Z.I., Solonin, A.S., Sineva, E.V., Ternovsky, V.I. (2008) Pore Forming Proteins and adaptation of living organisms to environmental conditions. *Biochem (Moscow)* **73**(13): 1473-1492
- Andreu, B. (1958) Sobre el cultivo del mejillón en Galicia: biología, crecimiento y producción. *Industrias Pesqueras* (**745-746**): 44-47
- Andreu, B. (1965) Biología y parasitología del mejillón gallego. *Ciencias* **30**: 17-18
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R., Martinou, J.C. (2000) Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome C release from mitochondria. *Biochem J* **345**(2): 271-278
- Apraiz, I., Mi, J., Cristóbal, S. (2006) Identification of proteomic signatures of exposure to marine pollutants in mussels (*Mytilus edulis*). *Mol Cell Proteomics* **5**: 1274-1285
- Aravind, L., Dixit, V.M., Koonin, E.V. (2001) Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science* **291**: 1279-1284
- Arumugam, M., Romestand, B., Torrelles, J., Roch, P. (2000) *In vitro* production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *Eur J Cell Biol* **79**: 513-519

-
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J. (1989) The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* **6**(6): 593-597
- Ashikawa, K., Shishodia, S., Fokt, I., Priebe, W., Aggarwal, B.B. (2004) Evidence that activation of nuclear factor- κ B is essential for the cytotoxic effects of doxorubicin and its analogues. *Biochem Pharmacol* **67**: 353-364
- Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos (APROMAR). (2012) La acuicultura marina en España. Disponible en: <http://www.apromar.es/informes.asp>
- Athanasopoulou, S., Marioli, D., Mikrou, A., Papanastasiou, A.D., Zarkadis, I.K. (2009) Cloning and characterization of the trout perforin. *Fish Shellfish Immunol* **26**: 908-912
- Auffret, M. (1988) Bivalve hemocyte morphology. *Am Fish Soc Spec Pub* **18**: 169-177
- Auffret, M. y Oubella, R. (1997) Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: *In vitro* measurement and experimental modulation by xenobiotics. *Comp Biochem Physiol* **118A**: 705-712
- Austin, B. (2005) Bacteria pathogens of marine fish. Págs: 391-413 en: *Ocean and Health Pathogens in the Marine Environment*. Belkin, S. y Colwell, R.R. (eds). Springer-Verlag. New York (U.S.A)
- Badiu, D.L., Luque, R., Dumitrescu, E., Craciun, A., Dinca, D. (2010) Amino acids from *Mytilus galloprovincialis* (L.) and *Rapana venosa* molluscs accelerate skin wounds healing via enhancement of dermal and epidermal neof ormation. *Protein J* **29**(2): 81-92
- Baier-Anderson, C., y Anderson, R.S. (2000) The effects of chlorothalonil on oyster hemocyte activation: phagocytosis, reduced pyridine nucleotides, and reactive oxygen species production. *Environ Res* **83**: 72-78
- Balseiro, P. (2008) Diagnóstico de epizootias en moluscos de interés comercial cultivados en Galicia. Contribución al conocimiento patológico de *Haliotis tuberculata* L. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Vigo
- Balseiro, P., Falcó, A., Romero, A., Dios, S., Martínez-López, A., Figueras, A., Estepa, A., Novoa, B. (2011) *Mytilus galloprovincialis* myticin C: a chemotactic molecule with antiviral activity and immunoregulatory properties. *PLoS ONE* **6**(8): 1-14
- Banni, M., Negri, A., Rebelo, M., Rapallo, F., Boussetta, H., Viarengo, A., Dondero, F. (2009) Expression analysis of the molluscan p53 protein family mRNA in mussels (*Mytilus* spp.) exposed to organic contaminants. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **149**: 414-418
- Baran, K., Dunstone, M., Chia, J., Ciccone, A., Browne, K.A., Clarke, C.J., Lukoyanova, N. y colaboradores (2009) The molecular basis for perforin oligomerization and transmembrane pore assembly. *Immunity* **30**: 684-695

- Barcia, R. y Ramos-Martínez, J. I. (2008) Effects of interleukin-2 on nitric oxide production in molluscan innate immunity. *Inv Surv J* **5**: 43-49
- Barcia, R., Cao, A., Arbeteta, J., Ramos-Martínez, J.I. (1999) The IL-2 receptor in hemocytes of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *IUBMB Life* **48**: 419-423
- Bardach, J.E., Richter, J.H., McLarney, W.O. (1972) *Aquaculture. The farming and husbandry of freshwater and marine organisms.* John Wiley & Sons, Inc., New York (U.S.A)
- Baršienė, J., Andreikėnaitė, L., Garnaga, G., Rybakovas, A. (2008) Genotoxic and cytotoxic effects in the bivalve molluscs *Macoma balthica* and *Mytilus edulis* from the Baltic Sea. *Ekologija* **54**: 44-50
- Batista, F.M., Arzul, I., Pepin, J.F., Ruano, F., Friedman, C.S, Boudry, P., Renault, T. (2007) Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA by PCR in bivalve molluscs: a critical review. *J Virol Methods* **139**: 1-11
- Baylon, C.B. (1990) *Culture of bivalve mollusks.* FAO Document Repository. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- Bayne, B.L. (1976) *Marine mussels, their ecology and their physiology.* Bayne, B.L (ed). Cambridge University Press, Cambridge (Reino Unido)
- Bayne, B.L. (1991) The biology and cultivation of mussels. *Aquaculture*: **94**: 121-278
- Bayne, C.J. (1990) Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. Phagocytosis appears to be an ancient line of defence. *Bioscience* **40**: 723-731
- Bayne, C.J., Moore, M.N., Carefoot, T.H., Thompson, R.J. (1979) Hemolymph functions in *Mytilus californianus*: The cytochemistry of hemocytes and their responses to foreign implants and hemolymph factors in phagocytosis. *J Invertebr Pathol* **34**: 1-20
- Bayne, C.J., Sminia, T., Van der Knaap, W.P.W. (1980) Immunological memory: status of molluscan studies. Págs: 57-64 en: *Phylogeny of immunological memory.* Manning, M.J. (ed). Elsevier, Amsterdam
- Beiras, R. y His, E. (1995) Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival and growth of *Mytilus galloprovincialis* mussel larvae. *Mar Ecol Prog Ser* **126**: 185-189
- Bender, C.E., Fitzgerald, P., Tait, S.W.G., Llambi, F., McStay, G.P., Tupper, D.O., Pellettieri, J., Sánchez Alvarado, A., Salvesen, G.S., Green, D.R. (2012) Mitochondrial pathway of apoptosis is ancestral in metazoans. *PNAS* **109** (13): 4904-4909
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Von Heijne, G., Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**: 783-795
- Bergsbaken, T., Fink, S.L., Cookson, B.T. (2009) Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol* **7**(2): 99-109
- Bernardi, P. (1999) Mitochondria in muscle cell death. *Ital J Neurol Sci* **20**(6): 395-400

-
- Berthe, F.C.J., Le Roux, F., Adlard, R.D., Figueras, A. (2004). Marteiliosis in molluscs: a review. *Aquat Living Resour* **17**: 433-448
- Best, S.M., y Bloom, M.E. (2004) Caspase activation during virus infection: more than just the kiss of death? *Virology* **320**: 191-194
- Bettaieb, A. y Averill-Bates, D.A. (2005) Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis. *J Cell Physiol* **205**(1): 47-57
- Betti, M., Ciacci, C., Lorusso, L.C., Canonico, B., Falcioni, T., Gallo, G., Canesi, L. (2006) Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on *Mytilus haemocytetes*: role of stress-activated mitogen-activated protein kinases (MAPKs). *Biol Cell* **98**: 233-244
- Bevelander, G., y Nakahara H. (1969) An electron microscope study of the formation of the nacreous layer in the shell of certain bivalve molluscs. *Calc Tiss Res* **3**: 84-92
- Bhardwaj, A. y Aggarwal, B.B. (2003) Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol* **23**: 317-332
- Billen, L.P., Shamas-Din, A., Andrews, D.W. (2009) Bid: a Bax-like BH3 protein. *Oncogene* **27**: 93-104
- Bischofberger, M., González, M.R., Van der Goot, F.G. (2009) Membrane injury by pore-forming proteins. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 589-595
- Bjørnstad, A., Larsen, B.K., Skadsheim, A., Jones, M.B., Andersen, O.K. (2006) The potential of ecotoxicoproteomics in environmental monitoring: biomarker profiling in mussel plasma using protein chip array technology. *J Toxicol Environ Health Part A* **69**: 77-96
- Black, R. A., Kronheim, S. R., Sleath, P.R. (1989) *FEBS Lett* **247**: 386-390
- Blumenthal, R., Millard, P.J., Henkart, M.P., Reynolds, C.W., Henkart, P.A. (1984) Liposomes as targets for granule cytolysin from cytotoxic large granular lymphocyte tumors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **81**: 5551-5555
- Boatright, K.M., y Salvesen, G.S. (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 725-731
- Boise, L.H., Gonzalez-García, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X. y colaboradores. (1993) Bcl-x, a Bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74**: 597-608
- Borja, A., Bricker, S.B., Dauer, D.M., Demetriades, N.T., Ferreira, J.G., Forbes, A.T., Hutchings, P. y colaboradores. (2008) Overview of integrative tools and methods in assessing ecological integrity in estuarine and coastal systems worldwide. *Mar Pollut Bull* **56**: 1519-1537
- Borner, C. (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* **39**(11): 615-647

- Borrego, J.J., Luque, A., Castro, D., Santamaria, J.A., Martinez-Manzanares, E. (1996a) Virulence factors of *Vibrio* P1, the causative agent of brown ring disease in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Aquat Living Resour* **9**: 125-136
- Bose, R., Chen, P., Loconti, A., Grulich, C., Abrams, J. M., Kolesnick, R. N. (1998). Ceramide generation by the reaper protein is not blocked by the caspase inhibitor, p35. *J Biol Chem* **273**: 28852-28859
- Boshra, H., Li, J., Sunyer, J.O. (2006) Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol* **20**: 239-262
- Böttger, A. y Alexandrova, O. (2007) Programmed cell death in Hydra. *Semin Cancer Biol* **17**: 134-146
- Böttger, S., Jerszyk, E., Low, B., Walker, C. (2008) Genotoxic stress-induced expression of p53 and apoptosis in leukemic clam hemocytes with cytoplasmically sequestered p53. *Cancer Res* **68**: 777-782
- Boudreau, N. J. y Jones, P.L. (1999) Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J* **339**(3): 481-488
- Bownes, S.J y McQuaid, C.D. (2006) Will the invasive mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck replace the indigenous *Perna perna* L. on the south coast of South Africa? *J Exp Mar Biol Ecol* **338**: 140-151
- Branch, G. M. y Stephani, C. N. (2003) Spatial comparisons of populations of an indigenous limpet *Scutellastra argenvillei* and an alien mussel *Mytilus galloprovincialis* along a gradient of wave energy. *Afr J Mar Sci* **25**(1): 195-212
- Bredt, D.S. y Snyder, S.H. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(2): 682-685
- Bridgham, J.T., Wilder, J.A., Hollocher, H., Johnson, A.L (2003) All in the family: evolutionary and functional relationship among death receptors. *Cell Death Differ* **10**: 19-25
- Broitman, B.R., Blanchette, C.A., Menge, B.A., Lubchenco, J., Krenz, C., Foley, M., Raimondi, P.T. y colaboradores. (2008) Spatial and temporal patterns of invertebrate recruitment along the west coast of the United States. *Ecol Monogr* **78**: 403-421
- Brüne, B., Von Knethen, A., Sandau, K.B. (1999) Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death Differ* **6**(10): 969-975
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **15**: 269-290
- Buggé, D.M., Hegaret, H., Wikfors, G.H., Allam, B. (2007) Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* **23**: 188-196
- Bulgakov, A.A., Park, K.I., Choi, K.S., Lim, H.K., Cho, M. (2004) Purification and characterization of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. *Fish Shellfish Immunol* **16**: 487-499

-
- Burrenson, E.M y Ford, S.E. (2004) A review of recent information on the Haplosporidia, with special reference to *Haplosporidium nelsoni* (MSX disease). *Aquat Living Resour* **17**: 499-517
- Bursch, W. (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* **8**: 569-581
- Bustamante, J., Caldas-Lopes, E., García, M., Di Libero, E., Álvarez, E., Hajos, S.E. (2004) Disruption of mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by PSC 833 and CsA in multidrug-resistant lymphoid leukemia. *Toxicol Appl Pharmacol* **199**: 44-51
- Byoung, S., Kwon, M.W., Chau-Ching, L., Persechini, P.M., Trapani, J.A., Asifa, K.H., Yeong, K. y colaboradores (1989) The structure of the mouse lymphocyte pore-forming protein perforin. *Biochem Biophys Res Commun* **158**: 1-10
- Cáceres-Martínez, J y Figueras, A. (1998a) Distribution and abundance of mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) larvae and post-larvae in the Ria de Vigo (NW Spain). *J Exp Mar Biol Ecol* **229**: 277-287
- Cáceres-Martínez, J. y Figueras, A. (1998b) Mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) colonisation of artificial substrates in the Ria de Vigo (NW Spain). *J Shellfish Res* **17**: 153-157
- Cáceres-Martínez, J. y Figueras, A. (1998c) Long-term survey on wild and cultured mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) reproductive cycles in the Ria de Vigo (NW Spain). *Aquaculture* **162**:141-156
- Cajaraville, M.P. y Pal, S.G. (1995) Morphofunctional study of the haemocytes of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. *Cell Struct Funct* **20**: 355-67
- Campbell, K.J., Rocha, S., Perkins, N.D. (2004) Active repression of antiapoptotic gene expression by relA(p65) NF-B. *Mol Cell* **13**: 853-865
- Campos, A., Tedesco, S., Vasconcelos, V., Cristobal, S. (2012) Proteomic research in bivalves: towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. *J Proteomics* **75**(14):4346-4359
- Cande, C., Cecconi, F., Dessen, P., Kroemer, G. (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* **115**: 4727-4734
- Canesi, L., Betti, M., Ciacci, C., Scarpato, A., Citterio, B., Pruzzo, C., Gallo, G. (2002b) Signalling pathways involved in the physiological response of mussel hemocytes to bacterial challenge: the role of stress-activated p38 MAP kinases. *Dev Comp Immunol* **26**: 325-334
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., Pruzzo, C. (2002a) Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in bivalves. *Microsc Res Technol* **57**: 469-476
- Canestri, T.G., Baccarani, E.M., Giannetto, S., Giuffrida, A., Paesanti, F. (1998) Prevalence of *Mytilicola intestinalis* (Copepoda: Mytilicolidae) and *Urastoma cyprinae* (Turbellaria: Hypotrichinidae) in marketable mussels *Mytilus galloprovincialis* in Italy. *Dis Aquat Org* **32**: 145-149

- Cao, A., Ramos-Martínez, J.I., Barcia, A. (2004) *In vitro* effects of LPS, IL-2, PDGF and CRF on hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Fish Shellfish Immunol **16**: 215-225
- Carballal, M.J., López, C., Azevedo, C., Villalba, A. (1997) *In vitro* study of the phagocytic of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Haemocytes. Fish Shellfish Immunol **7**: 403-416
- Carlton, J.T. (1992) Introduced marine and estuarine molluscs of North America: an end-of-the-20th-century perspective. J. Shellfish Res **11**: 489-505
- Carnegie, R.B., Barber, B.J., Distel, D.L. (2003) Detection of the oyster parasite *Bonamia ostreae* by fluorescent *in situ* hybridization. Dis Aquat Org **55**: 247-252
- Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J. y colaboradores. (1992) Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. Science **256**: 97-100
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong S.A., Letai, A. (2006) Cancer cell. mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. Cancer Cell **9** (5): 351-365
- Chang, C.C., Yeh, M.S., Lin, H.K., Cheng, W. (2008) The effect of *Vibrio alginolyticus* infection on caspase-3 expression and activity in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol **25**: 672-678
- Chang, K.H., Kim, K. S., Kim, J.H. (1999) N-acetylcysteine increases the biosynthesis of recombinant EPO in apoptotic Chinese hamster ovary cells. Free Radic Res **30**(2): 85-91
- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Bulet, P. (1996) Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. J Biol Chem **271**(36): 21808-21813
- Châtel, A., Hamer, B., Jakšić, Z., Vucelić, V., Talarmin, H., Dorange, G., Schröder, H.C. y colaboradores. (2011) Induction of apoptosis in mussel *Mytilus galloprovincialis* gills by modelcytotoxic agents. Ecotoxicology **20**: 2030-2041
- Chen, C. (2012) Mechanism of BAG1 repair on Parkinson's disease-linked DJ1 mutation. J Biomol Struct Dynam **30**(1): 1-12
- Cheng, T.C. (1981) Bivalves. Págs: 233-300 en: Invertebrate blood cells. Ratcliffe, N.A. y Rowley, A.F (eds). Academic Press 1. Londres (Reino Unido)
- Cheng, T.C. y Rifkin, E. (1970) Cellular reactions in marine molluscs in response to helminth paratitism. Págs: 443-496 en: A simposium on diseases of fishes and shellfishes. Am Fish Soc Spec Pub **5**
- Cheng, T.C., Rodrick, G.E., Foley, D.A., Koehler, S.A. (1975) Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. J Invertebr Pathol **25**: 261-265

-
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., Green, D.R. (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**: 1010-1014
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., Green, D.R. (2010) The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* **37**: 299-310
- Chiu, C.T., Yeh, T.S., Hsu, J.C., Chen, M.F. (2003) Expression of Bcl-2 family modulated through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* **48**(4): 670-676
- Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G.K. (2008) Caspases. An update. *Comp Biochem Phys* **151**: 10-27
- Chu, F. L. E. (1988) Humoral defense factors in marine bivalves. Págs: 178-188 en: *Disease processes in marine bivalve molluscs*. Am Fish Soc Spec Pub **18**
- Chun, H.J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C.K., Siegel, R.M., Dale, J.K. y colaboradores. (2002) Caspases leave the beaten track: caspase-mediated activation of NF-kappaB. *Nature* **419**(6905): 395-399
- Ciacci, C., Betti, M., Canonico, B., Citterio, B., Roch, P., Canesi, L. (2010) Specificity on anti-Vibrio immune response through p38 MAPK and PKC activation in the hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *J Invertebr Pathol* **105**: 49-55
- Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Böttger, A., David, C.N. (1999) Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol* **9**: 959-962
- Circu, M.L. y Aw, T.Y. (2008) Glutathione and apoptosis. *Free Radic Res* **42**(8): 689-706
- Cohen, G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326**: 1-16
- Cokol, M., Nair, R., Rost, B. (2000) Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep* **1**(5): 411-415
- Colin, J., Gaumer, S., Guenal, I., Mignotte, B. (2009) Mitochondria, Bcl-2 family proteins and apoptosomes: of worms, flies and men. *Front Biosci* **14**:4127-4137
- Colwell, R.R. (1996) Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science* **274**: 2031-2025
- Comesaña, A.S., Posada, D., Sanjuan, A. (1998) *Mytilus galloprovincialis* Lmk in northern Africa. *J Exp Mar Bio Ecol* **223**: 271-283
- Comisión Europea. (2006) Regulation 510/2006. Official Journal of the European Union C 320/12
- Comps, M., Bonami, J. R., Vago, C., Campillo, A. (1976) Une virose de l'huitre portugaise (*Crassostrea angulata* Lmk). *CR Acad Sci Paris Serie D* **282**: 1991-1993

- Cong, R., Sun, W., Liu, G., Fan, T., Meng, X., Yang, L., Zhu, L. (2005) Purification and characterization of phenoloxidase from clam *Ruditapes philippinarum*. Fish Shellfish Immunol **18**: 61-70
- Conradt, B., Horvitz, H.R. (1998) The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. Cell **93**: 519-529
- Conus, S., Perozzo, R., Reinheckel, T., Peters, C., Scapozza, L., Yousefi, S., Simon, H. (2008) Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation. JEM **205**(3): 685-698
- Cooper, D.M., Granville, D.J., Lowenberger, C. (2009) The insect caspases. Apoptosis **14**: 247-256
- Cory, S. y Adams, J.M. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nat Rev Cancer **2**: 647-656
- Costa, M.M. (2008) Estudio de la respuesta inmune y expresión génica del mejillón mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*). Tesis Doctoral. Universidad de Vigo. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Vigo
- Costa, M.M., Dios, S., Alonso-Gutiérrez, J., Romero, A., Novoa, B., Figueras, A. (2009a) Evidence of high individual diversity on myticin C in mussel (*Mytilus galloprovincialis*). Dev Comp Immunol **33**: 162-170
- Costa, M.M., Prado-Alvarez, M., Gestal, C., Li, H., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A. (2009b) Functional and molecular immune response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. Fish Shellfish Immunol **26**: 515-523
- Craft, J.A., Gilbert, J.A., Temperton, B., Dempsey, K.E., Ashelford, K., Tiwari, B., Hutchinson, T.H. y colaboradores. (2010) Pyrosequencing of *Mytilus galloprovincialis* cDNAs: Tissue-Specific Expression Patterns. PLoS ONE **5**(1): e8875. doi:10.1371/journal.pone.0008875
- Crespo, C.A., García Caballero, T., Beiras, A., Espinosa, J. (1990) Evidence from sperm ultrastructure that the mussel of Galician estuaries is *Mytilus galloprovincialis* Lamarck. J. Molluscan Stud **56**: 127-128
- Dagda, R.K., Cherra, S.J., Kulich, S.M., Tandon, A., Park, D., Chu, C.T. (2009) Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission. J Biol Chem **284**(20): 13843-13855
- Dahms, H.U. y Lee, J.S. (2010) UV radiation in marine ectotherms: molecular effects and responses. Aquat Toxicol **97**(1): 3-14
- David, C.N., Schmidt, N., Schade, M., Pauly, B., Alexandrova, O., Böttger, A. (2005) Hydra and the evolution of apoptosis. Integr Comp Biol **45**: 631-638
- Davidson, E.H. (1986) Gene Activity in Early Development. Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc. Academic Press. New York (U.S.A)
- De Zoysa, M., Jung, S., Lee, J. (2009a) First molluscan TNF-alpha homologue of the TNF superfamily in disk abalone: molecular characterization and expression analysis. Fish Shellfish Immunol **26**(4): 625-631

-
- De Zoysa, M., Nikapitiya, C., Moon, D.O., Whang, I., Kim, G.Y., Lee, J. (2009b) A novel Fas ligand in mollusk abalone: molecular characterization, immune responses and biological activity of the recombinant protein. *Fish Shellfish Immunol* **27**: 423-432
- Dégremont, L. (2011) Evidence of herpesvirus (OsHV-1) resistance in juvenile *Crassostrea gigas* selected for high resistance to the summer mortality phenomenon. *Aquaculture* **317**(1-4): 94-98
- Deleage, G., Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. (2001) ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Comput Biol Med* **31**: 259-267
- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., Old, L.J. (1979) Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **76**: 2420-2424
- DeLeo, F.R. (2004) Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. *Apoptosis* **9**: 399-413
- Delivani, P., Adrain, C., Taylor, R.C., Duriez, P.J., Martin, S.J. (2006) Role for CED-9 and Egl-1 as regulators of mitochondrial fission and fusion dynamics. *Mol Cell* **21**(6): 761-773
- Deveraux, Q. L. y Reed, J. C. (1999) IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**: 239-252
- Dey, A., Tergaonkar, V., Lane, D.P. (2008) Double-edged swords as cancer therapeutics: simultaneously targeting p53 and NF- κ B pathways. *Nature* **7**: 1031-1040
- Dheilly, N.M., Haynes, P.A., Bove, U., Nair, S.V., Raftos, D.A. (2011) Comparative proteomic analysis of a sea urchin (*Heliocidaris erythrogramma*) antibacterial response revealed the involvement of apextrin and calreticulin. *J Invertebr Pathol* **106**: 223-229
- Dikkeboom, R., Tijnagel, J.M.G.H., Van der Knaap, W.P.W. (1988) Monoclonal antibody recognized hemocyte subpopulations in juvenile and adult *Lymnaea sfagnahs*: functional characteristics and lectin binding. *Dev Comp Immunol* **12**: 17-32
- Disalvo, L.H., Blecka, J., Zebal, R. (1978) *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a Californian coastal shellfish hatchery. *Appl Environ Microbiol* **35**: 219-221
- Dixon, E.P., Stephenson, D.T., Clemens, J.A., Little, S.P. (1997) Bcl-X short is elevated following severe global ischemia in rat brains. *Brain Res* **776**: 222-229
- Diz, A.P y Presa, P. (2008) Regional patterns of microsatellite variation in *Mytilus galloprovincialis* from the Iberian Peninsula. *Marine Biology* **154**(2): 277-286
- Diz, A.P y Presa, P. (2009) The genetic diversity pattern of *Mytilus galloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). *Aquaculture* **287**: 278-285
- Donaghy, L., Kim, B., Hong, H., Park, H., Choi, K. (2009) Flow cytometry studies on the populations and immune parameters of the hemocytes of the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*. *Fish Shellfish Immun* **27**: 296-301

- Dondero, F., Piacentini, L., Marsano, F., Rebelo, M., Vergani, L., Venier, P., Viarengo, A. (2006) Gene transcription profiling in pollutant exposed mussels (*Mytilus spp.*) using a new low-density oligonucleotide microarray. *Gene* **376**(1): 24-36
- Dorstyn, L., Mills, K., Lazebnik, Y., Kumar, S. (2004) The two cytochrome C species, DC3 and DC4, are not required for caspase activation and apoptosis in *Drosophila* cells. *J Cell Biol* **167**: 405-410
- Dorstyn, L., Read, S., Cakouros, D., Huh, J.R., Hay, B.A., Kumar, S. (2002) The role of cytochrome C in caspase activation in *Drosophila melanogaster* cells. *J Cell Biol* **156**(6): 1089-1098
- Dorstyn, L., y Kumar, S. (2006) A cytochrome C-free fly apoptosome. *Cell Death Differ* **13**(7): 1049-1051
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome C-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**(1): 33-42
- Dunn, S.R., Phillips, W.S., Spatafora, J.W., Green, D.R., Weis, V.M. (2006) Highly conserved caspase and Bcl-2 homologues from the sea anemone *Aiptasia pallida*: lower metazoans as models for the study of apoptosis evolution. *J Mol Evol* **63**: 95-107
- Duvaux-Miret, O., Stefano, G.B., Smith, E.M., Dissous, C., Capron, A. (1992) Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoreactive neuropeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 778-781
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**: 383-424
- Ecker, A., Pinto, S.B., Baker, K.W., Kafatos, F.C., Sinden, R.E. (2007) *Plasmodium berghei*: Plasmodium perforin-like protein 5 is required for mosquito midgut invasion in *Anopheles stephensi*. *Exp Parasitol* **116**: 504-508
- Eckhart, L., Fischer, H., Tschachler, E. (2007) Phylogenomics of caspase-activated DNA fragmentation factor. *Biochem Biophys Res Commun* **356**: 293-299
- Edinger, A.L. y Thompson, C.B. (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **16**(6): 663-669
- Ekert, P.G. y Vaux, D.L. (2005) The mitochondrial death squad: hardened killers or innocent bystanders? *Curr Opin Cell Biol* **17**(6): 626-630
- Elimadi, A., Morin, D., Sapena, R., Chauvet-Monges, A.M., Crevat, A., Tillement, J.P. (1997) Comparison of the effects of cyclosporine A and trimetazidine on Ca²⁺-dependent mitochondrial swelling. *Fundam Clin Pharmacol* **11**: 440-447
- Ellis, H.M. y Horvitz, H.R. (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**: 817-829
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**: 495-516

-
- Elston, R. (1980) Functional morphology of the coelomocytes of the larval oysters (*Crassostrea virginica* and *Crassostrea gigas*). J Mar Biol Assoc **60**: 947-957
- Elston, R. A. y Wilkinson, M.T. (1985) Pathology, management and diagnosis of oyster velar virus disease (OVVD). Aquaculture **48**: 189-210
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature **391**:43-50
- Everaarts, J.M. y Sarkar, A. (1996) DNA damage as a biomarker of marine pollution: strand breaks in sea stars (*Asterias rubens*) from the North Sea. Water Sci Technol **34**: 157-162
- Fadeel, B., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (1999b) Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? Biochem Biophys Res Commun **266**(3): 699-717
- Fang, W., Rivard, J.J., Mueller, D.L., Behrens, T.W. (1994) Cloning and molecular characterization of mouse bcl-x in B and T lymphocytes. J Immunol **153**:4388-4398
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2012) SOFIA: el estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. Roma (Italia)
- Farcy, E., Fleury, C., Lelong, C., Dubos, M.P., Voiseux, C., Fiévet, B., Lebel., J.M. (2008) Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression level. Mar Environ Res **66**: 300-308
- Farris, J.L., y Van Hassel, J.H. (2006) Freshwater Bivalve Ecotoxicology. Taylor and Francis Inc. CRC Press England (United Kingdom)
- Feig, C. y Peter, M.E. (2007) How apoptosis got the immune system in shape. Eur J Immunol **37**: 61-70
- Feng, S.Y. (1988) Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. Am Fish Soc Spec Pub **18**: 153-168
- Feng, S.Y., Feng, J.S., Burke, C.N., Khairallah, L.H. (1971) Light and electron microscopy of the leucocytes of *Crassostrea virginica* (Mollusca-Pelecypoda). Z Zellforsch Mikrosk Anat **120**: 222-245
- Fernández, B., Campillo, J.A., Martínez-Gómez, C., Benedicto, J. (2010) Antioxidant responses in gills of mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as biomarkers of environmental stress along the Spanish Mediterranean coast. Aquat Toxicol **99**(2): 186-197
- Fernández-Tajes, J., Rábade, T., Laffon, B., Méndez, J. (2011) Monitoring follow up of two areas affected by the Prestige oil four years after the spillage. J Toxicol Environ Health **74**: 1067-1075
- Figueras, A y Novoa, B. (2011) Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en acuicultura. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Vigo (España)

- Figueras, A., Jardon, C.F., Caldas, J.R. (1991) Diseases and parasites of rafted mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk): preliminary results. *Aquaculture* **99**: 17-33
- Figueras, A., Robledo, J.A.F., Novoa, B. (1992) Occurrence of haplosporidian and Perkinsus-like infections in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus 1758), of the Ria de Vigo (Galicia, NW Spain). *J. Shellfish Res* **11**(2): 377-382
- Figueras, A.J. y Montes, J. (1988) Aber disease of edible oysters caused by *Marteilia refringens*. *Am Fish Soc Spec Pub* **18**: 38-46
- Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coghill, P., Heger, A., Pollington, J.E., Gavin, O.L. y colaboradores. (2010) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **38**: 211-222
- Finn, R.D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P.C., Sammut, S.J., Hotz, H. R., Ceric, G. y colaboradores. (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **36**: 281-288
- Fisher, W.S. (1986) Structure and functions of oyster hemocytes. En: *Immunity in invertebrates. Cells, molecules and defense reactions*. Brehélin, M. (ed). *Proceedings in Life Sciences*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Fleischer, A. y Rebollo, A. (2004) Induction of p53-independent apoptosis by the BH3-only protein ITM2Bs. *FEBS Lett* **16**(557):283-287
- Fleischer, A., Ayllon, V., Rebollo, A. (2002) ITMB2S regulates apoptosis by inducing loss of mitochondrial membrana potencial. *Eur J Immunol* **32**(12): 3498-34505
- Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F. y colaboradores (2001) Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* **153**: 999-1010
- Foley, D.A. y Cheng, T.C. (1974) Morphology, haematology parameters and behaviour of haemolymph cells of the quahaug clam, *Mercenaria mercenaria*. *Biol Bull* **146**: 343-356
- Forêt, S., Knack, B., Houliston, E., Momose, T., Manuel, M., Quéinnec, E., Hayward, D.C. y colaboradores (2010) New tricks with old genes: the genetic bases of novel cnidarian traits. *Trends Genet* **26**(4): 154-158
- Fournier, N., Ducet, G., Crevat, A. (1987) Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr* **19**: 297-303
- Fraga, F. (1981). Upwelling off the Galician Coast, Northwest Spain. Págs: 176-182 en: *Coastal Upwelling*. Richards, F.A. (ed.). American Geophysical Union. Washington, D.C. (U.S.A)
- Francisco, C.J., Hermida, M.A., Santos, M.J. (2010) Parasites and symbionts from *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (Bivalves: Mytilidae) of the Aveiro Estuary Portugal. *J Parasitol* **96**(1): 200-205
- Franco, M. (2006) A miticultura en Galicia: unha actividade de éxito e con futuro. *Opmeqa. Revista Galega de Economía* **15**(1): 251-256

-
- Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E.M., Panayiotidis, M.I. (2009) Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. *Mutat Res* **674**: 3-22
- Frohlich, K.U. y Madeo, F. (2000) Apoptosis in yeast a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett* **473**(1): 6-9
- Fuchs, Y. y Steller, H. (2011) Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* **147**(4): 742-758
- Gagnaire, B., Thomas-Guyon, H., Burgeot, T., Renault, T. (2006) Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell Biol Toxicol* **22**: 1-14
- Gaitanaki, C., Kefaloyianni, E., Marmari, A., Beis, I. (2004) Various stressors rapidly activate the p38-MAPK signaling pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) *Mol Cell Biochem* **260**: 119-127
- Galle, J., Heermeier, K., Wanner, C. (1999) Atherogenic lipoproteins, oxidative stress and cell death. *Kidney Int Suppl* **71**: 62-65
- Galliot, B. y Chera, S. (2010) The Hydra model: disclosing an apoptosis driven generator of Wnt-based regeneration. *Trends Cell Biol* **20**: 514-523
- Gamulin, V., Muller, I.M., Muller, W.E.G. (2000) Sponge proteins are more similar to those of *Homo sapiens* than to *Caenorhabditis elegans*. *Biol J Linn Soc Lond* **71**: 821-828
- García, L. (2009) Patrones de asentamiento y reclutamiento de *Mytilus galloprovincialis* en la Ría de Ares-Betanzos e implicaciones para su cultivo en batea. Tesis Doctoral. Universidade de A Coruña. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Vigo
- García-García, E., Prado-Álvarez, M., Novoa, B., Figueras, A., Rosales, C. (2008) Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. *Dev Comp Immunol* **32**(6): 637-653
- Gasque, P. (2004) Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol* **41**: 1089-1098
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExpASY Server. Págs: 571-607 en: *The proteomics protocols handbook*. Walker, J.M. (ed). Humana Press
- Geller, J. B. (1999) Decline of a native mussel masked by sibling species invasion. *Conserv Biol* **13**:661-664
- Geng, X., Shi, Y., Nakagawa, A. Yoshina, S., Mitani, S., Shi, Y., Xue, D. (2008) Inhibition of CED-3 zymogen activation and apoptosis in *Caenorhabditis elegans* by caspase homolog CSP-3. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 1094-1101
- Gerdol, M., De Moro, G., Manfrin, C., Venier, P., Pallavicini, A. (2012) Bid defensins and mytimacins, new AMP families of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Dev Comp Immunol* **36**: 390-399

- Gestal, C., Pallavicini, A., Venier, P., Novoa, B., Figueras, A. (2010) MgC1q, a novel C1q domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis*. *Dev Comp Immunol* **34**: 926-934
- Gestal, C., Roch, P., Renault, T., Pallavicini, A., Paillard, C., Novoa, B., Oubella, R. y colaboradores. (2008) Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics. *Rev Fisheries Sci* **16**(S1): 131-154
- Gifondorwa, D.J., y Leise, E.M. (2006) Programmed cell death in the apical ganglion during larval metamorphosis of the marine mollusc *Ilyanassa obsoleta*. *Biol Bull* **210**: 109-120
- Gilbert, R.J. (2010) Cholesterol-dependent cytolysins. *Adv Exp Med Biol* **677**: 56-66
- Glessner, J.T., Wang, K., Cai, G., Korvatska, O., Kim, C.E., Wood, S., Zhang, H. y colaboradores. (2009) Autism genome wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* **459**: 569-573
- Glinski, Z., y Jarosz, J. (1997) Molluscan immune defenses. *Arch Immunol Ther Exp* **45**: 149-155
- Goedken, M., Morsey, B., Sunila, I., De Guise, S. (2005) Immunomodulation of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* cellular defense mechanisms by *Perkinsus marinus*. *J Shellfish Res* **24**: 487-496
- Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.L., Green, D.R. (2000) The coordinate release of cytochrome C during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* **2**: 156-162
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W., Cong, J. (2003) The calpain system. *Physiol Rev* **83**(3): 731-801
- Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M.L., Novoa, B., Figueras, A. (2005) Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Appl Environ Microbiol* **71**: 98-104
- Gómez-Mendikute, A. y Cajaraville, M.P. (2003) Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzopyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicol in vitro* **17**: 539-546
- Gong, J., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z. (1994) A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* **218**: 314-319
- González, M. R., Bischofberger, M., Pernot, L., Van der Goot, F. G., Freche, B. (2008) Bacterial pore-forming toxins: the whole story? *Cell Mol Life Sci* **65**: 493-507
- González-García, M., Pérez-Ballesteros, R., Ding, L., Duan, L., Boise, L.H., Thompson, C.B., Núñez, G. (1994) Bcl-XL is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development* **120**(10): 3033-3042

-
- Gonzalez-Riopedre, M., Barcia, R., Ramos-Martinez, J.I. (2009) Implication of PKC isozymes in the release of biogenic amines by mussel hemocytes: effect of PDGF, IL-2 and LPS. *J Exp Zool* **311A**: 727-734
- Gorbushin, A.M. y Iakovleva, N.V. (2011) A new family of single fibrinogen domain lectins in *Mytilus*. *Fish Shellfish Immunol* **30**: 434-438
- Gosling E. (1992) *The Mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Elsevier, Amsterdam
- Gourdon, I., Gricourt, L., Kellner, K.L., Roch, P., Escoubas, J.M. (2000) Characterization of a cDNA encoding a 72 kDa heat shock cognate protein (Hsc72) from the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *DNA Seq* **11**: 265-270
- Green, D.R. y Kroemer, G. (1998) The central executioner of apoptosis: mitochondria or caspases? *Trends Cell Biol* **8**: 267-271
- Grether, M.E., Abrams, J.M., Agapite, J., White, K., Steller, H. (1995) The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes Dev* **9**(14): 1694-1708
- Gudkov, A.V. y Komarova, E.A. (2003) The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer* **3**(2): 117-129
- Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguère, C., Girardot, A.L., Garnier, J., Hoareau, A. y colaboradores. (2003) Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene* **303**: 139-145
- Guicciardi, M.E., Leist, M., Gores, G.J. (2004) Lysosomes in cell death. *Oncogene* **23**: 2881-2890
- Haag, E.S., Sly, B.J., Andrews, M.E., Raff, R.A. (1999) Apexrin, a novel extracellular protein associated with larval ectoderm evolution in *Helicoidaris erythrogramma*. *Dev Biol* **211**: 77-87
- Hadders, M.A., Beringer, D.X., Gros, P. (2007) Structure of C8 α -MACPF reveals mechanism of membrane attack in complement immune defense. *Science* **317**: 1552-1554
- Häder, D.P., Kumar, H.D., Smith, R.C., Worrest, R.C. (2007) Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci* **6**: 267-285
- Hale, A.J., Smith, C.A., Sutherland, L.C., Stoneman, V.E., Longthorne, V.L., Culhane, A.C., Williams, G.T. (1996) Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* **236**(1): 1-26
- Harvell, C.D., Mitchell, C.E., Ward, J.R., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S., Samuel, M.D. (2002) Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* **296**: 2158-2162
- Haszprunar, G. (2001) "Mollusca (Molluscs)". *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1038/npg.els.0001598

- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., Haupt, Y. (2003) Apoptosis-the p53 network. *J Cell Sci* **116**: 4077-4085
- He, C.B., Zhu, B., Liu, W.D., Bao, X.B., Li, Y.F., Shan, Z.G., Li, H.J. (2012) Cloning and expression analysis of lipopolysaccharide-induced TNF- α (LITAF) of Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*). *Yi Chuan* **34**(6): 736-741
- He, X., Zhang, Y., Yu, Z. (2011) An Mpeg (macrophage expressed gene) from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Molecular characterization and gene expression. *Fish Shellfish Immunol* **30**: 870-876
- Heermeier, K., Benedict, M., Li, M., Furth, P., Nunez, G., Hennighausen, L. (1996) Bax and Bclxs are induced at the onset of apoptosis in involuting mammary epithelial cells. *Mech Dev* **56**: 197-207
- Hehlgans, T., Pfeffer, K. (2005) The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunol* **115**: 1-20
- Hellio, C., Bado-Nilles, A., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H. (2007) Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol* **22**: 433-440
- Hemberger, M., Himmelbauer, H., Ruschmann, J., Zeitz, C., Fundele, R. (2000) cDNA subtraction cloning reveals novel genes whose temporal and spatial expression indicates association with trophoblast invasion. *Dev Biol* **222**: 158-169
- Hemmrich, G., Miller, D.J., Bosch, T.C. (2007) The evolution of immunity: a low-life perspective. *Trends Immunol* **28**: 449-454
- Hengartner, M.O. (2000).The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**(6805): 770-776
- Hengartner, M.O. y Horvitz, H.R. (1994) *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* **76**: 665-676
- Henke, N., Lisak, D.A., Schneider, L., Habicht, J., Pergande, M., Methner, A. (2011) The ancient cell death suppressor BAX inhibitor-1. *Cell Calcium* **50**: 251-260
- Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., Majeske, A.J., Cohen, A.H., Terwilliger, D.P., Buckley, K.M. y colaboradores. (2006) The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome *Dev Biol* **300**: 349-365
- Hine, P.M. (1999) The inter-relationship of bivalve hemocytes. *Fish Shellfish Immunol* **9**: 367-385
- Hine, P.M., Wesney, B., Hay, B.E. (1992) Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Dis Aquat Org* **12**: 135-142
- Ho, P., y Hawkins, C.J. (2005) Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS J* **272**: 5436-5453
- Hoffmann, J. A., Reichart, J.M., Hetru, C. (1996) Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol* **8**: 8-13

-
- Honegger, T.Z., Ürrer, D., Tardent, P. (1989) Oogenesis in *Hydra carnea*: a new model based on light and electron microscopic analysis of oocyte and nurse cell differentiation. *Tissue Cell* **21**: 381-393
- Horton, P., y Nakai, K. (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *ISMB* **5**: 147-152
- Hu, Y., Benedict, M.A., Wu, D., Inohara, N., Núñez, G. (1998a) Bcl-xL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(8): 4386-4391
- Hu, Y., Ding, L., Spencer, D.M., Núñez, G. (1998b) WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* **273**(50): 33489-33494
- Huang, G., Liu, H., Han, Y., Fan, L., Zhang, Q., Liu, J., Yu, X. y colaboradores. (2007) Profile of acute immune response in Chinese amphioxus upon *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Dev Comp Immunol* **31**: 1013-1023
- Huang, W.B., Ren, H.L., Gopalakrishnan, S., Xu, D.D., Qiao, K. Wang, K.J. (2010) First molecular cloning of a molluscan caspase from variously colored abalone (*Haliotis diversicolor*) and gene expression analysis with bacterial challenge. *Fish Shellfish Immunol* **28**: 587-595
- Huang, X., y Madan, A. (1999) CAP3: a ADN sequence assembly program. *Genome Res* **9**: 868-877
- Hubert, F., Van der Knaap, W., Noël, T., Roch, P. (1996a) Cytotoxic and antibacterial properties of *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (bivalve molluscs) hemolymph. *Aquat Liv Resour* **9**: 115-124
- Hughes, T.K.J., Smith, E.M., Chin, R., Cadet, P., Sinisterra, J., Leung, M.K., Shipp, M.A. y colaboradores. (1990) Interaction of immunoreactive monokines (interleukin 1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4426-4429
- Hussain, S.G., y Ramaiah, K.V.A. (2007) Review article: endoplasmic reticulum: stress, signaling and apoptosis. *Curr Sci* **93**(12): 1684-1696
- Hwang, J.Y., Ohira, T., Hirono, I. (2004) A pore-forming protein, perforin, from a non mammalian organism, Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Immunogenetics* **56**: 360-367
- Hwang, S.G., Lee, H.C., Lee, D.W., Kim, Y.S., Joo, W.H., Cho, Y.K., Moon, J.Y. (2001) Induction of apoptotic cell death by a p53-independent pathway in neuronal SK-N-MC cells after treatment with 2, 2', 5, 5'-tetrachlorobiphenyl. *Toxicology* **165**: 179-188
- Igaki, T. y Miura, M. (2004) Role of Bcl-2 family members in invertebrates. *Biochim Biophys Acta* **1644**: 73-81
- Igase, M., Okura, T., Kitami, Y., Hiwada, K. (1999) Apoptosis and bcl-xS in the intimal thickening of balloon-injured carotid arteries. *Clin Sci* **96**: 605-612

- Inohara, N. y Núñez, G. (2000) Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. *Cell Death Differ* **7**(5): 509-510
- Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X., Núñez, G. (1998) CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45kDa subunit of the ADN fragmentation factor. *EMBO J* **17**: 2526-2533
- Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S., Núñez, G. (1997) CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10717-10722
- Ishino, T., Chinzei, Y., Yuda, M. (2005) A Plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. *Cell Microbiol* **7**(2): 199-208
- Ishioka, C., Englert, C., Winge, P., Yan, Y.X., Engelstein, M., Friend, S.H. (1995) Mutational analysis of the carboxi-terminal portion of p53 using both yeast and mammalian cell assays *in vivo*. *Oncogene* **10**: 1485-1492
- Ivanova, S., Repnik, U., Bojič, Petelin, A., Turk, V., Turk, B. (2008) Lysosomes in apoptosis. *Method Enzymol* **442**: 183-199
- Iwanaga, S. y Lee, B.L. (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol* **38**: 128-150
- Jacobson, M.D., Weil, M., Raff, M.C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**: 347-354
- Jessen-Eller, K., Kreiling, J.A., Begley, G.S., Steele, M.E., Walker, C.W., Stephens, R.E., Reinisch, C.L. (2002) A new invertebrate member of the p53 gene family is developmentally expressed and responds to polychlorinated biphenyls. *Environ Health Perspect* **110**(4): 377-385
- Jiang, L., Luo, X., Shi, J., Sun, H., Sun, Q., Sheikh, M.S. y colaboradores. (2011) PDRG1, a novel tumor marker for multiple malignancies that is selectively regulated by genotoxic stress. *Cancer Biol Ther* **11**(6): 567-573
- Joza, N., Kroemer, G., Penninger, J.M. (2002) Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet* **18**(3): 142-149
- Kadota, K., Ishino, T., Matsuyama, T., Chinzei, Y., Yuda, M. (2004) Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 16310-16315
- Kafsack, B.F. y Carruthers, V.B. (2010) Apicomplexan perforin-like proteins. *Commun Integr Biol* **3**: 18-23
- Kafsack, B.F., Pena, J.D., Coppens, I., Ravindran, S., Boothroyd, J.C., Carruthers, V.B. (2009) Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells. *Science* **323**: 530-533
- Kaiser, K., Camargo, N., Coppens, I., Morrise, J.M., Vaidya, A.B., Kappe, S.H. (2004) A member of a conserved Plasmodium protein family with membrane-attack complex/perforin (MACPF)-like domains localizes to the micronemes of sporozoites. *Mol Biochem Parasitol* **133**: 15-26

-
- Kang, Y.S., Kim, Y.M., Park, K.I., Cho, S.K., Choi, K.S, Cho, M. (2006) Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. Dev Comp Immunol **30**: 1119-1131
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., Miyata, T. (2005) MAFFT version 5: Improvement in accuracy of multiple sequence alignment. Nucleic Acids Res **33**: 511-518
- Katsu, Y., Minshall, N., Nagahama, Y., Standart, N. (1999) Ca²⁺ is required for phosphorylation of clam p82/CPEB *in vitro*: implications for dual and independent roles of MAP and Cdc2 kinases. Dev Biol **209**: 186-199
- Kaufman, R.J. (1999) Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. Genes Dev **13**(10): 1211-1233
- Kaufmann, S.H. y Earnshaw, W.C. (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. Exp Cell Res **256**(1): 42-49
- Kaufmann, S.H. y Gores, G.J. (2000) Apoptosis in cancer: cause and cure. BioEssays **22**: 1007-1017
- Kawano, H., Nakatani, T., Mori, T., Ueno, S., Fukaya, M., Abe, A., Kobayashi, M. y colaboradores. (2004) Identification and characterization of novel developmentally regulated neural-specific proteins, BRINP family. Brain Res Mol **125**: 60-75
- Kefaloyianni, E., Gourgou, E., Ferle, V., Kotsakis, E., Gaitanaki, C., Beis, I. (2005) Acute thermal stress and various heavy metals induce tissue-specific pro- or anti-apoptotic events via the p38-MAPK signal transduction pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). J Exp Biol **208**: 4427-4436
- Kelley, M.L., Winge, P., Heaney, J.D., Stephens, R.E., Farrell, J.H., Van Beneden, R.J., Reinisch, C.L. y colaboradores. (2001) Expression of homologues for p53 and p73 in the soft shell clam (*Mya arenaria*), a naturally-occurring model for human cancer. Oncogene **20**: 748-758
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer **26**(4): 239-257
- Kilpatrick, D.C. (2002) Animal lectins: a historical introduction and overview. Biochim Biophys Acta **1572**(2-3): 187-197
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.C., Jeffers, J.R., Zametti, G.P., Hsieh, J.J., Cheng, E.H. (2006) Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by Bcl-2 subfamilies. Nat Cell Biol **8**: 1348-1358
- Kim, H., Tu, H., Ren, D., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J. y colaboradores. (2009) Stepwise activation of Bax and Bak by tBid, Bim and Puma initiates mitochondrial apoptosis. Molecular Cell **36**: 487-499
- Kim, S.O., Ono, K., Han, J. (2001) Apoptosis by pan-caspase inhibitors in lipopolysaccharide-activated macrophages. Am J Physiol Lung C **281**: 1095-1105

- Kimura, A., y Nonaka, M. (2009) Molecular cloning of the terminal complement components C6 and C8b of cartilaginous fish. *Fish Shellfish Immunol* **27**: 768-772
- Kiss, T. (2010) Apoptosis and its functional significance in mollusks. *Apoptosis* **15**: 313-321
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D. (1997a) The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**(5303): 1132-1136
- Kluck, R.M., Martin, S.J., Hoffman, B.M., Zhou, J.S., Green, D.R., Newmeyer D.D. (1997b) Cytochrome C activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J* **16**(5): 4639-4649
- Komarov, P.G., Komarova, E.A., Kondratov, R.V., Christov-Tselkov, K., Coon, J.S., Chernov, M.V., Gudkov, A.V. (1999) A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* **285**: 1733-1737
- Kondos, S.C., Hatfaludi, T., Voskoboinik, I., Trapani, J.A., Law, R.H.P., Whisstock, J.C., Dunstone, M.A. (2010) The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins. *Tissue Antigens* **76**: 341-351
- Koonin, E.V. y Aravind, L. (2002) Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death Differ* **9**(4): 394-404
- Kornbluth, S. y White, K. (2005) Apoptosis in *Drosophila*: neither fish nor fowl (nor man, nor worm). *J Cell Sci* **118**(9): 1779-1787
- Kostura, M.J., Tocci, M.J., Limjuco, G., Chin, J., Cameron, P., Hillman, A.G., Chartrain, N.A. y colaboradores. (1989) Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5227-5231
- Koutsogiannaki, S. y Kaloyianni, M. (2010) Signaling molecules involved in immune responses in mussels. *ISJ* **7**: 11-21
- Koyama, A.H., Adachi, A., Irie, H. (2003) Physiological significance of apoptosis during animal virus infection. *Int Rev Immunol* **22**: 341-359
- Kubota, Y., Watanabe, Y., Otsuka, H., Tamiya, T., Tsuchiya, T., Matsumoto, J.J. (1985) Purification and characterization of an antibacterial factor from snail mucus. *Comp Biochem Physiol C* **82**: 345-348
- Kucharczak, J., Simmons, M.J., Fan, Y., Gelinas, C. (2003) To be, or not to be: NF- κ B is the answer-role of Rel/NF- κ B in the regulation of apoptosis. *Oncogene* **22**: 8961-8982
- Kulms, D. y Schwarz, T. (2000) Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **16**(5): 195-201
- Kulms, D., Zeise, E., Pöppelmann., Schwarz, T. (2002) ADN damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. *Oncogene* **21**: 5844-5851

-
- Kumarswamy, R., Seth, R.K., Dwarakanath, B.S., Chandn, S. (2009) Mitochondrial regulation of insect cell apoptosis: evidence for permeability transition pore-independent cytochrome-c release in the Lepidopteran Sf9 cells. *Int J Biochem Cell Biol* **41**: 1430-1440
- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., Kobayashi, Y. (2003) Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* **171**(9): 4672-4679
- Kyriakis, J.M. y Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**: 807-869
- La Cour, T., Kiemer, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., Brunak, S. (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* **17**(6): 527-536
- Labarta, U., Fernández-Reiriz, M.J., Babarro, J.M.F. (1997) Differences in physiological energetic between intertidal and raft cultivated mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Mar Ecol Prog Ser* **152**: 167-173
- Lacal, J.C. (1997) Regulation of proliferation and apoptosis by Ras and Rho GTPases through specific phospholipid-dependent signaling. *FEBS Lett* **410**(1): 73-77
- Lacoste, A., Cueff, A., Poulet, S.A. (2002) P35-sensitive caspases, MAP kinases and Rho modulate b-adrenergic induction of apoptosis in mollusc immune cells. *J Cell Sci* **115**: 761-768
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Gélébart, F., Cordevant, C., Lange, M. y colaboradores. (2001a) A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis Aquat Org* **46**: 139-145
- Lacoste, A., Jalabert, F., Malham, S., Cueff, A., Poulet, S.A. (2001b) Stress and stress-induced neuroendocrine changes increase the susceptibility of juvenile oysters (*Crassostrea gigas*) to *Vibrio splendidus*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2304-2309
- Lambert, C., Leonard, N., De Bolle, X., Depiereux, E. (2002) ESpred3D: prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics* **18**: 1250-1256
- Lambert, C., Nicolas, J.L., Cilia, V., Corre, S. (1998c) *Vibrio pectinica* sp. nov., a pathogen scallop (*Pecten maximus*) larvae. *Int J System Bacteriol* **48**: 481-487
- Lambert, C., Soudant, P., Degremont, L., Delaporte, M., Moal, J., Boudry, P., Jean, F. y colaboradores. (2007) Hemocyte characteristics in families of oysters, *Crassostrea gigas*, selected for differential survival during summer and reared in three sites. *Aquaculture* **270**(1-4): 276-288
- Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X., Vandenaabeele, P. (2002) Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* **9**: 358-361

- Lamkanfi, M., Declercq, W., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P. (2006) Caspases leave the beaten track: caspase-mediated activation of NF- κ B. *J Cell Biol* **173**(2): 165-171
- Lancellotti, M., Brocchi, M., da Silveira, W.D. (2006) Bacteria-induced apoptosis: an approach to bacterial pathogenesis. *Braz J Morphol Sci* **23**: 75-86
- Lane, D.P. y Crawford, L.V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**: 261-263
- Lardans, V., Coppin, J.F., Vicogne, J., Aroca, E., Delcroix, M., Dissous, C. (2001) Characterization of an insulin receptor-related receptor in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. *Biochem Biophys Acta* **1510**: 321-329
- Lasi, M. (2009) Das komplexe netzwerk apoptose regulierender proteine in Hydra. Tesis Doctoral. Ludwig-Maximilians-University. Munich
- Lasi, M., David, C.N., Böttger, A. (2010b) Apoptosis in pre-bilaterians: Hydra as a model. *Apoptosis* **15**: 269-278
- Lasi, M., Pauly, B., Schmidt, N., Cikala, M., Stiening, B., Käsbauer, T., Zenner, G. y colaboradores. (2010a) The molecular cell death machinery in the simple cnidarian Hydra includes an expanded caspase family and pro and anti-apoptotic Bcl-2 proteins. *Cell Research* **20**: 812-825
- Lauckner, G. (1983) Diseases of Mollusca: Bivalvia. Págs: 477-961 en: Diseases of marine animals. Introduction, Bivalvia to Scaphopoda. Kinne, O. (ed). Biologische Anstalt Hegoland **2**. Hamburg (Alemania)
- Le Roux, F., Gay, M., Lambert, C., Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J.L. y colaboradores. (2002) Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat Living Resour* **15**: 251-258
- Lee, E.F., Clark, O.B., Evangelista, M., Feng, Z., Speed, T.P., Tchoubrieva, E.B., Strasser, A. y colaboradores. (2011) Discovery and molecular characterization of Bcl-2-regulated cell death pathway in schistosomes. *PNAS* **108**(17): 6999-7003
- Lee, G.H., Kim, H.K., Chae, S.W., Kim, D.S., Ha, K.C., Cuddy, M., Kress, C. y colaboradores. (2007) Bax inhibitor-1 regulates endoplasmic reticulum stress-associated reactive oxygen species and heme oxygenase-1 expression. *J Biol Chem* **282**: 21618-21628
- LeGrand, E.K. (1997) An adaptationist view of apoptosis. *Q Rev Biol* **72**: 135-147
- Leist, M. y Jäättelä, M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Rev Mol Cell Biol* **2**: 589-598
- Lesch, K.P., Timmesfeld, N., Renner, T.J., Halperin, R., Röser, C., Nguyen, T.T., Craig, D.W. y colaboradores. (2008) Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies. *J Neural Transm* **115**: 1573-1585

-
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., Korsmeyer, S.J. (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**: 183-192
- Letunic, I., Doerks, T., Bork, P. (2012) SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res* **40D1**: D302-305
- Levin, R.E. (2006) *Vibrio parahaemolyticus*, a notably lethal human pathogen derived from seafood: a review of its pathogenicity, characteristics, subspecies characterization, and molecular methods of detection. *Food Biotechnol* **20**: 93-128
- Lhafi, S.K y Kühne, M. (2007) Occurrence of *Vibrio spp.* in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. *Int J Food Microbiol* **116**(2): 297-300
- Li, G. y Ho, V.C. (1998) p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high-and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol* **139**: 3-10
- Li, H. (2009) The regulation of Drosophila inhibitor of apoptosis protein in apoptosis and cell survival. Tesis Doctoral. University of Michigan. Michigan
- Li, H., Parisi, M.G., Toubiana, M., Cammarata, M., Roch, P. (2008) Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. *Fish Shellfish Immunol* **25**(1-2): 143-152
- Li, H., Venier, P., Prado-Álvarez, Gestal, C., Toubiana, M. (2010) Expression of *Mytilus* immune genes in response to experimental challenges varied according to the site of collection. *Fish Shellfish Immunol* **28**: 640-648
- Li, H.J., Yang, Q., Gao, X.G., Su, H., Wang, J., He, C.B. (2012) Identification and expression of a putative LPS-induced TNF- α factor from Asiatic hard clam *Meretrix meretrix*. *Mol Biol Rep* **39**(2): 865-871
- Li, L., Chang, M.X., Nie, P. (2007) Molecular cloning, promoter analysis and induced expression of the complement component C9 gene in the grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Vet Immunol Immunopathol* **118**: 270-282
- Li, L., Qiu, L., Song, L., Song, X., Zhao, J., Wang, L., Mu, C. y colaboradores. (2009) First molluscan TNFR homologue in Zhikong scallop: molecular characterization and expression analysis. *Fish Shellfish Immunol* **27**(5): 625-632
- Li, L.Y., Luo, X., Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**(6842): 95-99
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X. (1997) Cytochrome C and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489
- Li, Y., Zhang, Z., Xu, Y., Ni, W., Chen, S., Yang, Z., Ma, D. (2006) N-Acetyl-L-cysteine and pyrrolidine dithiocarbamate inhibited nuclear factor- κ B activation in alveolar macrophages by different mechanisms. *Acta Pharm Sinic* **27**(3): 339-346

- Lichtenheld, M.G., Olsen, J.J., Lu, P., Lowrey, D.M., Hameed, A., Hengartner, H., Podack, E.R. (1988) Structure and function of human perforin. *Nature* **335**: 448-451
- Liew, F.Y. y Cox, F.E.G. (1991) Non specific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunoparasitol*: 17-21
- Linzer, D.I. y Levine, A.J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**:43-52
- Little, T.J, Hultmark, D., Read, A.F. (2005) Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nat. Immunol* **6**: 651-654
- Liu, C.C., Walsh, C.M., Young, J.D. (1995) Perforin: structure and function. *Immunol Today* **16**: 194-201
- Liu, J., Farmer, J.D.J., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S.L. (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506. *Cell* **66**(4): 807-815
- Liu, P., Xu, B., Cavalieri, T.A., Hock, C.E. (2006) Pifithrina attenuates p53-mediated apoptosis and improves cardiac function in response to myocardial ischemia/reperfusion in aged rats. *Shock* **26**(6): 608-614
- Liu, Q.A. y Hengartner, M.O. (1999) The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann N Y Acad Sci* **887**: 92-104
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C. *Cell* **86**(1): 147-157
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**(2): 175-184
- Livak, K. y Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-timequantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C} (T) Method. *Methods* **25**: 402-408
- Lockshin, R.A. y Zackeri, Z. (2004) Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(12): 2405-2419
- Loeffler, M. y Kroemer, G. (2000) The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* **256**(1): 19-26
- Lopes, E.C., García, M., Benavides, F., Shen, J., Conti, C.J., Álvarez, E., Hajos, S.E. (2003) Multidrug resistance modulators PSC 833 and CsA show differential capacity to induce apoptosis in lymphoid leukemia cell lines independently of their MDR phenotype. *Leuk Res* **27**: 413-423
- López, A. (2005) Acuicultura como herramienta para el desarrollo. Programa NAUTA. Agencia Española de Cooperación Internacional. España

-
- López, C., Carballal, M.J., Azevedo, C., Villalba, A. (1997) Morphological characterization of the hemocytes of the clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). *J Invertebr Pathol* **69**: 51-57
- López, J.L., Marina, A., J. Vázquez, E., Álvarez, G. (2002) A proteomic approach to the study of the marine mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Mar Biol* **141**: 217-223
- López-Castejón, G., Sepulcre, M.P., Mulero, I., Pelegrín, P., Meseguer, J., Mulero, V. (2008) Molecular and functional characterization of gilthead seabream *Sparus aurata* caspase-1: the first identification of an inflammatory caspase in fish. *Mol Immunol* **45**(1): 49-57
- Lubet, P. (1959) Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilides et les pectinides (Mollusques bivalves). *Rev Trav Inst Pêches Marit* **23**: 478-479
- Lubet, P. (1973) Exposé synoptique des données biologiques sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) (Atlantique et Méditerranée). Synopsis FAO sur les pêches **88**: 1-54. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. Roma (Italia)
- Lubet, P.E. y Mathieu, M. (1999) Applications a la conchyliculture des récentes acquisitions sur la biologie des mollusques bivalves. *L'Année Biologique* **38**: 27-50
- Lucas, A. y Beninger, P. (1985) The use of physiological condition indices in marine bivalvia aquaculture. *Aquaculture* **44**: 187-200
- Lukyanova, N. y Saibil, H.R. (2008) Friend or foe: the same fold for attack and defense. *Trends Immunol* **29**: 51-53
- Luo, T., Yang, H., Li, F., Zhang, X., Xu, X. (2006) Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* **30**: 607-617
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome C release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**: 481-490
- Luo, X., Huang, Y., Sheikh, M.S. (2003) Cloning and characterization of a novel gene PDRG that is differentially regulated by p53 and ultraviolet radiation. *Oncogene* **22**: 7247-7257
- Lynch-Day, M.A., Mao, K., Wang, K., Zhao, M., Klionsky, D.J. (2012) The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(4): a009357
- Madaule, P., Axel, R. (1985) A novel ras-related gene family. *Cell* **41**(1): 31-40
- Mah, S.A., Moy, G.W., Swanson, W.J., Vacquier, V.D. (2004) A perforin-like protein from a marine mollusk. *Biochem Biophys Res Commun* **316**: 468-475
- Marastoni, S., Ligresti, G., Lorenzon, E., Colombatti, A., Mongiat, M. (2008) Extracellular matrix: a matter of life and death. *Connect Tissue Res* **49**(3-4): 203-206

- Mariussen, E., Myhre, O., Reistad, T., Fonnum, F. (2002) The polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 induces death of rat cerebellar granule cells: the involvement of the N-methyl-D-aspartate receptor and reactive oxygen species. *Toxicol Appl Pharmacol* **179**: 137-144
- Marteil, L. (1976) La conchyliculture française. 2e partie. *Rev Trav Inst Pêches Marit* **40**: 125-320
- Martin, J.R., Raibaud, A., Olo, R. (1994) Terminal pattern elements in *Drosophila* embryo induced by the torso-like protein. *Nature* **367**: 741-745
- Martin, K.R., Kari, F.W., Barrett, J.C., French, J.E. (2000) N-acetyl-L-cysteine simultaneously increases mitogenesis and suppresses apoptosis in mitogen-stimulated B-lymphocytes from p53 haploinsufficient Tg.AC (v-Ha-ras) mice. *Vitr Mol Toxicol* **13**: 237-248
- Martin, S.S. y Vuori, K. (2004) Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. *Biochim Biophys Acta* **1692**(2-3): 145-157
- Martinez-Lage, A., Insua, A., Martinez-Expósito, M.J., Méndez, J. (1992) Estudio comparativo entre una población de mejillón gallego y otra de mejillón mediterráneo. Págs: 57-63 en: Seminario internacional do mexillón. Cuadernos da área de Ciencias Mariñas. Publicacións do seminario de estudos galegos **6**. Edicións do Castro. Sada. A Coruña (España)
- Martinon, F. y Tschopp, J. (2005) NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Tds Immunol* **26**: 447-454
- Masson, D. y Tschopp, J. (1985) Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *J Biol Chem* **260**(16): 9069-9072
- Matozzo, V., Rova, G., Marin, M.G. (2007) Haemocytes of the cockle *Cerastoderma glaucum*: morphological characterisation and involvement in immune responses. *Fish Shellfish Immunol* **23**(4): 732-746
- McDonald, J.H y Koehn, R.K. (1988) The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America. *Mar Biol* **99**: 111-118
- McDonald, J.H., Seed, R., Koehn, R.K. (1991) Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the northern and southern hemispheres. *Mar Biol* **111**: 323-333
- McGreal, E.P., Martinez-Pomares, L., Gordon, S. (2004) Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol Immunol* **41**(11): 1109-1121
- Means, J.C., Muro, I., Clem, R.J. (2006) Lack of involvement of mitochondrial factors in caspase activation in a *Drosophila* cell-free system. *Cell Death Differ* **13**(7): 1222-1234
- Mialhe, E., Bachère, E., Chagot, D., Grizel, H. (1988) Isolation and purification of the protozoan *Bonamia ostreae* (Pichot y col. 1980), a parasite affecting the flat oyster *Ostrea edulis* L. *Aquaculture* **71**: 293-299
- Miao, E.A., Leaf, I.A., Treuting, P.M., Mao, D.P., Dors, M., Sarkar, A., Warren, S.E. y colaboradores. (2010) Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune

-
- effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol* **11**(12):1136-1142
- Mignotte, B. y Vayssière, J.L. (1988) Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem* **252**: 1-15
- Mikrou, A., Zarkadis, I.K. (2010) Short communication. Cloning of the sixth complement component and, spatial and temporal expression profile of MAC structural and regulatory genes in chicken *Dev Comp Immunol* **34**: 485-490
- Miller, D.J., Hemmrich, G., Ball, E.E., Hayward, D.C., Khalturin, K., Funayama, N., Agata, K. y colaboradores. (2007) The innate immune repertoire in cnidaria ancestral complexity and stochastic gene loss. *Genome Biol* **8**: 59
- Minn, A.J., Boise, L.H., Thompson, C.B. (1996) Bcl-x(S) antagonizes the protective effects of Bcl-x(L). *J Biol Chem* **271**: 6306-6312
- Minsuk, S.B., y Raff, R.A. (2002) Pattern formation in a pentamerous animal: induction of early adult rudiment development in sea urchins. *Dev Biol* **247**: 335-350
- Mitchelmore, C.L. y Chipman, J.K. (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and potential value of the Comet assay in environmental monitoring. *Mutat Res* **399**: 135-147
- Mitta, G., Hubert, F., Dyrzynda, E.A., Boudry, P., Roch, P. (2000b) Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Dev Comp Immunol* **24**: 381-393
- Mitta, G., Hubert, F., Noël, T., Roch, P. (1999a) Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur J Biochem* **265**: 71-78
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M., Roch, P. (2000a) Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defence. *J Biol Chem* **275**: 12954-12962
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Roch, P. (2000c) Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett* **486**(3): 185-190
- Molares, J. y Fuentes, J. (1995) Recruitment of the mussel *Mytilus galloprovincialis* on collectors situated on the intertidal zone in the Ria de Arousa (NW Spain). *Aquaculture* **138**(1-4): 131-137
- Molleran Lee, S., Villanueva, J., Sumegi, J., Zhang, K., Kogawa, K., Davis, J., Filipovich, A.H. (2004) Characterisation of diverse PRF1 mutations leading to decreased natural killer cell activity in North American families with haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet* **41**: 137-144
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**(2): 109-142
- Montagnani, C., Kappler, C., Reichhart, J.M., Escoubas, J.M. (2004) Cg-Rel, the first Rel/NF- κ B homolog characterized in a mollusk, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Lett* **561**: 75-82

- Monti, D., Salvioli, S., Cossarizza, A., Franceschi, C., Ottaviani, E. (1992) Cytotoxicity and cell death: studies on molluscan cells and evolutionary considerations. *Acta Biol Hung* **43**: 287-291
- Moore, M.N. y Lowe, D.W. (1977) The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. *J Invertebr Pathol* **29**: 18-30
- Moore, M.N., Koehn, R.K., Bayne, B.L. (2005) Leucine aminopeptidase (aminopeptidase-I), N-acetyl- β -hexosaminidase and lysosomes in the mussel, *Mytilus edulis* L., in response to salinity changes. *J Exp Zool* **214**(3): 239-249
- Moreira R, Balseiro P, Planas JV, Fuste B, Beltran S, Novoa B, Figueras A. (2012b) Transcriptomics of in vitro immune-stimulated hemocytes from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* using high-throughput sequencing. *PLoS One* **7**(4):e35009. doi: 10.1371/journal.pone.0035009
- Moreira, R., Balseiro, P., Romero, A., Dios, S., Posada, B., Novoa, A., Figueras, A. (2012a) Gene expression analysis of clams *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus* following bacterial infection yields molecular insights into pathogen resistance and immunity. *Dev Comp Immunol* **36**(1): 140-149
- Morga, B., Arzul, I., Chollet, B., Renault, T. (2009) Infection with the protozoan parasite *Bonamia ostreae* modifies *in vitro* haemocyte activities of flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish Shellfish Immunol* **26**(6): 836-842
- Morga, B., Renault, T., Faury, N., Arzul, I. (2012) New insights in flat oyster *Ostrea edulis* resistance against the parasite *Bonamia ostreae*. *Fish Shellfish Immunol* **32**(6): 958-968
- Moroz, L.L. y Kohn, A.B. (2010) Do different neurons age differently? Direct genome-wide analysis of aging in single identified cholinergic neurons. *Front Aging Neurosci* **2**: 6
- Mortensen, S.H., Glette, J. (1996) Phagocytotic activity of the scallop *Pecten maximus* haemocytes maintained *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol* **6**: 178-184
- Morvan, A., Boulo, V., Despres, B., Hervio, D., Bachkre, E., Mialhe, E. (1991) Monoclonal antibodies against hemocytes of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia). *Dev Comp Immunol* **15**(1): S73
- Moschino, V., Delaney, E., Meneghetti, F., Ros, L.D. (2011) Biomonitoring approach with mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) and clam *Ruditapes philippinarum* (Adams y Reeve, 1850) in the Lagoon of Venice. *Environ Monit Assess* **177**(1-4): 649-663
- Mount, A.S., Wheeker, A.P., Paradkar, R.P., Snider, D. (2004) Hemocyte-mediated shell mineralization in the Eastern Oyster. *Science* **304**: 297-300
- Mullainadhan, P. y Renwranz, L. (1986) Lectin-dependent recognition of foreign cells by hemocytes of the mussel, *Mytilus edulis*. *Immunobiol* **171**: 263-273
- Muller-Eberhard, H.J. (1986) The membrane attack complex of complement system. *Annu Rev Immunol* **4**: 503-528

-
- Mund, T., Gewies, A., Schoenfeld, N., Bauer, M.K., Grimm, S. (2003) Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *Faseb J* **17**(6): 696-698
- Murahashi, H., Azuma, H., Zamzami, N., Furuya, K., Ikebuchi, K., Yamaguchi, M., Yamada, Y. y colaboradores. (2003) Possible contribution of apoptosis-inducing factor (AIF) and reactive oxygen species (ROS) to UVB-induced caspase independent cell death in the T cell line Jurkat. *J Leukocyte Biol* **73**: 399-406
- Murphy, P.J., Galigniana, M.D., Morishima, Y., Harrell, J.M., Kwok, R.P., Ljungman, M., Pratt, W.B. (2004) Pifithrin-alpha inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. *J Biol Chem* **279**(29): 30195-30201
- Muttray, A.F., Cox, R.L., St-Jean, S., Van Poppel, P., Reinisch, C.L., Baldwin, S.A. (2005) Identification and phylogenetic comparison of p53 in two distinct mussel species (*Mytilus*). *Comp Biochem Physiol, Part C* **140**: 237-250
- Muzio, M. (1998) Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis. *Int J Clin Lab Res* **28**: 141-147
- Nadiri, A., Wolinski, M.K., Saleh, M. (2006) The inflammatory caspases: key players in the host response to pathogenic invasion and sepsis. *J Immunol* **177**(7): 4239-4245
- Nagai, H., Oshiro, N., Takuwa-Kuroda, K., Iwanaga, S., Nozaki, M., Nakajima, T. (2002a) Novel proteinaceous toxins from the nematocyst venom of the Okinawan sea anemone *Phyllodiscus semoni* Kwietniewski. *Biochem Biophys Res Commun* **294**: 760-763
- Nagai, H., Oshiro, N., Takuwa-Kuroda, K., Iwanaga, S., Nozaki, M., Nakajima, T. (2002b) A new polypeptide toxin from the nematocyst venom of an Okinawan sea anemone *Phyllodiscus semoni* (Japanese name "unbachi-isoginchaku"). *Biosci Biotechnol Biochem* **66** (12): 2621-2625
- Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* **256**: 12-18
- Naismith, J.H. y Sprang, S.R. (1998) Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci* **23**(2): 74-79
- Nakajima, K., Takahashi, A., Yaoita, Y. (2000) Structure, expression, and function of the *Xenopus laevis* caspase family. *J Biol Chem* **275**(14):10484-10491
- Narain, A.S. (1973) The amoebocytes of lamellibranch molluscs, with special reference to the circulating amoebocytes. *Malacol Rev* **6**: 1-12
- Natarajan, K., y Cowan, J.A. (1998) Solution structure of a synthetic lytic peptide: The perforin amino terminus. *Chem Biol* **5**: 147-154
- Nathan, C. y Xie, Q.W. (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* **269**: 13725-13728
- Nechushtan, A., Smith, C.L., Lamensdorf, I., Yoon, S.H., Youle, R.J. (2001) Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* **153**(6): 1265-1276

- Neff, J.M. y Anderson, J.W. (1981) Response of marine animals to petroleum and specific petroleum hydrocarbons. Applied Science Publishers Ltd. London (United Kingdom)
- Newmeyer, D.D., Bossy-Wetzell, E., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Beere, H.M., Green, D.R. (2000) Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ* **7**(4): 402-407
- Nicolas, J.L., Comps, M., Cochennec, N. (1992) Herpes-like virus infecting Pacific oyster larvae, *Crassostrea gigas*. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* **12**(1): 2-13
- Noël, D., Pipe, R., Bache, E., Mialhe, E., (1994) Antigenic characterization of hemocyte subpopulations in the mussel *Mytilus edulis* using monoclonal antibodies. *Mar Biol* **119**: 549-556
- Novas, A., Cao, A., Barcia, R., Ramos-Martínez, J.I. (2004) Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 390-394
- Oakes, S.A., Lin, S.S., Bassik, M.C. (2006) The control of endoplasmic reticulum-initiated apoptosis by the BCL-2 family of proteins. *Curr Mol Med* **6**: 99-109
- Oberst, A., Bender, C., Green, D.R. (2008) Living with death: the evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals. *Cell Death Differ* **15**(7): 1139-1146
- O'Brate, A. y Giannakakou, P. (2003) The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zipcode? *Drug Resist Updat* **6**(6): 313-322
- Odo, S., Kamino, K., Kanai, S., Maruyama, T., Harayama, S. (1995) Biochemical characterization of a Ca(2+)-dependent lectin from the hemolymph of a photosymbiotic marine bivalve, *Tridacna derasa* (Roding). *J Biochem* **117**(5): 965-73
- Ordás, M.C., Novoa, B., Figueras, A. (2000) Modulation of the chemiluminescence response of Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* **10**(7): 611-622
- Oren, M. (2003) Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* **10**: 431-442. doi:10.1038/sj.cdd.4401183
- Oshiro, N., Kobayashi, C., Iwanaga, S., Nozaki, M., Namikoshi, M., Spring, J., Nagai, H. (2004) A new membrane-attack complex/perforin (MACPF) domain lethal toxin from the nematocyst venom of the Okinawan sea anemone *Actinaria villosa*. *Toxicon* **43**: 225-228
- Ottaviani, E., Franchini, A., Cassanelli, S., Genedani, S. (1995) Cytokines and molluscan immune responses. *Biol Cell* **85**: 87-91
- Ottaviani, E., Franchini, A., Franceschi, C. (1997b) Pro-opiomelanocortin-derived peptides, cytokines and nitric oxide in immune responses and stress: an evolutionary approach. *Int Rev Cytol* **170**: 79-141

-
- Ottaviani, E., Franchini, A., Hanukoglu, I. (1998b) *In situ* localisation of ACTH receptor-like mRNA in molluscan and human immunocytes. *Cell Mol Life Sci* **54**: 139-142
- Ouwe-Missi-Oukem-Boyer, O., Porchet, E., Capron, A., Dissous, C. (1994) Characterization of immunoreactive TNF alpha molecules in the gastropod *Biomphalaria glabrata*. *Dev Comp Immunol* **18**: 211-218
- Ozaki, K., Takeda, H., Iwahashi, H., Kitano, S., Hanazawa, S. (1997) NF-UB inhibitors stimulate apoptosis of rabbit mature osteoclasts and inhibit bone resorption by these cells. *FEBS Letters* **410**: 297-300
- Padhi, A., Verghese, B. (2008) Molecular diversity and evolution of myticin-C antimicrobial peptide variants in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Peptides* **29**: 1094-1101
- Paillard, C. (2004) A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Living Resour* **17**: 467
- Paillard, C. y Maes, P. (1990) Étologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: pathogenicit  d'un *Vibrio* sp. *C R Acad Sci Paris* **310**: 15-20
- Paillard, C., Le Roux, R., Borrego, J.J. (2004) Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat Living Resour* **17**: 477-498
- Paillard, C., Percelay, L., Le Pennec, M., Le Picard, D. (1989) Origine pathog ne de «l'anneau brun» chez *Tapes philippinarum* (Mollusque, bivalve). *C R Acad Sci Paris* **309**: 235
- Pallavicini, A., Costa, M.M., Gestal, C., Dreos, R., Figueras, A., Venier, P., Novoa, B. (2008) High sequence variability of myticin transcripts in hemocytes of immune-stimulated mussels suggests ancient host-pathogen interactions. *Dev Comp Immunol* **32**: 231-226
- Pan, M.H., Chen, M., Huang, S.J., Yu, Z.S., Cheng, C.G., Lu, C. (2009) Cloning and protein release of cytochrome C in the apoptosis cells of silkworm, *Bombyx mori*. *Sci Agr Sinica* **42**(7): 2546-2551
- Parisi, M.G., Li, H., Jouv t, L.B., Dyrinda, E.A., Parrinello, N., Cammarata, M., Roch, P. (2008) Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. *Fish Shellfish Immunol* **25**(6): 834-840
- Park, E.M., Kim, Y.O., Nam, B.H., Kong, H.J., Kim, W.J., Lee, S.J., Kong, I.S. y colaboradores. (2008) Cloning, characterization and expression analysis of the gene for a putative lipopolysaccharide-induced TNF-[alpha] factor of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shell Immunol* **24**: 11-17
- Parker, M.W., y Feil, S.C. (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol* **88**: 91-142
- Peitsch, M.C., Amiguet, P., Guy, R., Brunner, J., Maizel, J.V. J., Tschopp, J. (1990) Localization and molecular modelling of the membrane-inserted domain of the

- ninth component of human complement and perforin. *Mol Immunol* **27**: 589-602
- Pelicano, H., Carney, D., Huang, P. (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* **7**: 97-110
- Pelkonen, O. y Nebert, D.W. (1982) Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol Rev* **34**: 189-222
- Pérez-Reyes, P.L., Sánchez-Alonso, J.A., López-Aparicio, P., Recio, M.N., Pérez-Albarsanz, M.A. (2001) Different molecular capacity in the induction of apoptosis by polychlorinated biphenyl congeners in rat renal tubular cell cultures. *Biosci Rep* **6**: 765-778
- Pernet, F., Barret, J., Le Gall, P., Corporeau, C., Dégremont, L., Lagarde, F., Pépin, J.F. y colaboradores. (2012) Mass mortalities of Pacific oysters *Crassostrea gigas* reflect infectious diseases and vary with farming practices in the Mediterranean Thau lagoon, France. *Aquacult Environ Interact* **2**: 215-237
- Persechini, P.M., Ojcius, D.M., Adeodato, S.C., Notaroberto, P.C., Daniel, C.B., Young, J.D. (1992) Channel-forming activity of the perforin N-terminus and a putative α -helical region homologous with complement C9. *Biochem* **31**: 5017-5021
- Philipp, E.E.R., Kraemer, L., Melzner, F., Poustka, A.J., Thieme, S., Findeisen, U., Schreiber, S. y colaboradores. (2012) Massively parallel RNA sequencing identifies a complex. Immune gene repertoire in the lophotrochozoan *Mytilus edulis*. *PLoS ONE* **7**(3): e33091
- Pipe, R.K. (1990a) Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem J* **22**: 595-603
- Pipe, R.K. (1992) Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev Comp Immunol* **16**: 111-122
- Podack, E.R. (1985) The molecular mechanism of lymphocyte mediated tumor lysis. *Immunol Today* **6**: 12
- Podack, E.R. (2009) How to polymerize in order to survive. *Immunity* **30**: 668-670
- Podack, E.R., Deyev, V., Shiratsuchi, M. (2007) Pore Formers of the Immune System. *Adv Exp Med Biol* **598**: 325-341
- Podack, E.R., Hengartner, H., Lichtenheld, M.G. (1991) A central role of perforin in cytotoxicity? *Annu Rev Immunol* **9**: 129-157
- Ponting, C.P. (1999) Chlamydial homologues of the MACPF (MAC/perforin) domain. *Curr Biol* **9**: 911-913
- Pradelli, L.A., Beneteau, M., Ricci, J.E. (2010) Mitochondrial control of caspase-dependent and independent cell death. *Cell Mol Life Sci* **67**: 1589-1597
- Prado-Álvarez, M., Romero, A., Balseiro, P., Dios, S., Novoa, B., Figueras, A. (2012) Morphological characterization and functional immune response of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) haemocytes after bacterial stimulation. *Fish Shellfish Immunol* **32**: 69-78

-
- Proietti De Santis, L., Balajee, A.S., Lorenti-Garcia, C., Pepe, G., Montes-Worboys, A., Palitti, F. (2003) Inhibition of p53, p21 and Bax by pifithrin- α does not affect UV induced apoptotic response in CS-B cells. *ADN Repair* **2**: 891-900
- Pronk, G.J., Ramer, K., Amiri, P., Williams, L.T. (1996) Requirement of an ICE-like protease for induction of apoptosis and ceramide generation by REAPER. *Science* **271**: 808-810
- Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., Gabai, V.L. (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* **283**(1): 1-16
- Prota, G. (1994) Melanins, melanogenesis and skin photoprotection. *Eur J Cancer* **30A**: 553-554
- Pruzzo, C., Gallo, G., Canesi, L. (2005a) Minireview: persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. *Environ Microbiol* **7**(6): 761-772
- Pruzzo, C., Huq, A., Colwell, R.R., Donelli, G. (2005b) Pathogenic *Vibrio* species in the marine and estuarine environment. Págs: 217-252 en: *Ocean and Health Pathogens in the Marine Environment*. Belkin, S. y Colwell, R.R. (eds). Springer-Verlag. New York (U.S.A)
- Qiu, L., Song, L., Yu, Y., Zhao, J., Wang, L., Zhang, Q. (2009) Identification and expression of TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6) gene in Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol* **26**(3): 359-367
- Quinn, L.M., Dorstyn, L., Mills, K., Colussi, P.A., Chen, P., Coombe, M., Abrams, J. y colaboradores. (2000) An essential role for the caspase dronc in developmentally programmed cell death in *Drosophila*. *J Biol Chem* **275**(51): 40416-40424
- Raff, M. (1998) Cell suicide for beginners. *Nature* **396**: doi:10.1038/24055
- Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W., Rhodes, C.P. (1985) Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int Rev Cytol* **97**: 183-350
- Raymond, M., Mollica, L., Vigneault, N., Désormeaux, A., Chan, J.S.D., Filep, J.G., Hébert, M. (2003) Blockade of the apoptotic machinery by cyclosporine A redirects cell death toward necrosis in arterial endothelial cells: regulation by reactive oxygen species and cathepsin D. *FASEB J* **17**: 515-517
- Reddig, P.J. y Juliano, R.L. (2005) Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metast Revi* **24**(3): 425-439
- Reed, J.C., Jurgensmeier, J.M., Matsuyama, S. (1998) Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1366**(1-2): 127-137
- Reis, M.I.R., Nascimento, D.S., do Vale, A., Silva, M.T., dos Santos, N.M.S. (2007) Molecular cloning and characterization of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) caspase-3 gene. *Mol Immunol* **44**: 774-783
- Reiter, Y., Ciobotariu, A., Jones, J., Morgan, B.P., Fishelson, Z. (1995) Complement membrana attack complex, perforin, and bacterial exotoxins induce in K562 cells calcium-dependent cross-protection from lysis. *J Immunol* **155**: 2203-2210

- Renault, T. y Novoa, B. (2004) Viruses infecting bivalve mollusks. *Aquatic Living Resources* **17**(4): 397-409
- Renault, T., Faury, N., Barbosa-Solomieu, V., Moreau, K. (2011) Suppression substractive hybridisation (SSH) and real time PCR reveal differential gene expression in the Pacific cupped oyster, *Crassostrea gigas*, challenged with Ostreid herpesvirus 1. *Dev Comp Immunol* **35**: 725-735
- Renwrantz, L., Daniels, J., Hansen, P.D. (1985) Lectin-binding to hemocytes of *Mytilus edulis*. *Dev Comp Immunol* **9**: 203-210
- Repnik, U. y Turk, B. (2010) Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion* **10**: 662-669
- Rieber, M., y Rieber, M.S. (2003) N-Acetylcysteine enhances UV-mediated caspase-3 activation, fragmentation of E2F-4, and apoptosis in human C8161 melanoma: Inhibition by ectopic Bcl-2 expression. *Biochem Pharmacol* **65**: 1593-1601
- Riedl, S.J., y Shi, Y. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 897-907
- Risso-de Faverney, C., Orsini, N., De Sousa, G., Rahmani, R. (2004) Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: involvement of oxidative stress. *Aquat Toxicol* **69**(3): 247-258
- Roberts, S., Goetz, G., White, S., Goetz, F. (2009) Analysis of genes isolated from plated hemocytes of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Mar Biotechnol* **11**: 24-44
- Roberts, S., Gueguen, Y., de Lorgeril, J., Goetz, F. (2008) Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure. *Dev Comp Immunol* **32**: 1099-1104
- Robertson, A.J., Croce, J., Carbonneau, S., Voronina, E., Miranda, E., McClay, D.R., Coffman, J.A. (2006) The genomic underpinnings of apoptosis in *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev Biol* **300**: 321-334
- Robinson, K.S., Clements, A., Williams, A.C., Berger, C.N., Frankel, G. (2011) Review: Bax Inhibitor 1 in apoptosis and disease. *Oncogene* **30**: 2391-2400
- Robinson, T.B y Griffiths, C.L. (2002) Invasion of Langebaan Lagoon, South Africa, by *Mytilus galloprovincialis* -effects on natural communities. *Afr Zool* **37**: 151-158
- Robledo, J.A.F., Cáceres-Martínez, J., Sluys, R., Figueras, A. (1994) The parasitic turbellarian *Urastonia cyprinae* (Platyhelminthes-Urastomidae) from blue mussel *Mytilus galloprovincialis* in Spain: occurrence and pathology. *Dis Aquat Org* **18**: 203-210
- Roch, P., Yang, Y., Toubiana, M., Aumelas, A. (2008) NMR structure of mussel mytilin, and antiviral-antibacterial activities of derived synthetic peptides. *Dev Comp Immunol* **32**: 227-238
- Rodríguez, J. y Lazebnik, Y. (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **13**: 3179-3184

-
- Romero, A., Dios, S., Poisa-Beiro, L., Costa, M.M., Posada, D., Figueras, A., Novoa, B. (2011b) Individual sequence variability and functional activities of fibrinogen related proteins(FREPs) in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) suggest ancient and complex immune recognition models in invertebrates. *Dev Comp Immunol* **35**: 334-344
- Rosado, C., Kondos, S., Bull, T.E., Kuiper, M.J., Law, R.H.P., Buckle, A.M., Voskoboinik, I. y colaboradores. (2008) The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cell Microbiol* **10**: 1765-1774
- Rosado, C.J., Buckle, A.M., Law, R.H.P., Butcher, R.E., Kan, W., Bird, C.H., Ung, K. y colaboradores. (2007) A common fold mediates vertebrate defense and bacterial attack. *Science* **317**: 1548-1551
- Rosani, U., Varotto, L., Rossi, A., Roch, P., Novoa, B., Figueras, A., Pallavicini, A. y colaboradores. (2011). Massively parallel amplicon sequencing reveals isotype-specific variability of antimicrobial peptide transcripts in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS ONE* **6**(11): 1-11
- Rost, B., Yachdav, G., Liu, J. (2003) The Predict Protein Server. *Nucleic Acids Res* **32** (Web Server issue): W321-W326
- Rozen, S., y Skaletsky, H.J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Págs: 365-386 en: *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Krawetz, S. y Misener, S. (eds). Humana Press. Totowa, New York (U.S.A)
- Ruiz, M., Tarifeño, E., Llanos-Rivera, A., Padget, C., Campos, B. (2008) Efecto de la temperatura en el desarrollo embrionario y larval del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Rev Biol Mar Oceanogr* **43**: 51-61
- Saeij, J.P., Verburg-van Kemenade, L.B., Van Muiswinkel, W.B., Wiegertjes, G.F. (2003) Daily handling stress reduces resistance of carp to *Trypanoplasma orreli*: *in vitro* modulatory effects of cortisol on leukocyte unction and apoptosis. *Dev Comp Immunol* **27**: 233-245
- Saez, M.E., Ramírez-Lorca, R., Moron, F.J., Ruiz, A. (2006) The therapeutic potencial of the calpain family: new aspects. *Drug Discov Today* **11**(19-20): 917-923
- Saitou, N., y Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425
- Sakata, S., Yan, Y., Satou, Y., Momio, A., Ngo-Hazelett, P., Nozaki, M., Furutani-Seiki, M. y colaboradores. (2007) Conserved function of caspase-8 in apoptosis during bony fish evolution. *Gene* **396**: 134-148
- Salvesen, G.S. y Dixit, V.M. (1997) Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* **91**: 443-446
- Samain, J.F. y McCombie, H. (2008). Summer mortality of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. The Morest Project Versailles Quae Editions
- Sánchez, B.C., Ralston-Hooper, K., Sepúlveda, M.S. (2011) Review of recent proteomic applications in aquatic toxicology. *Environ Toxicol Chem* **30**(2): 274-282

- Sánchez, D., López-Arias, B., Torroja, L., Canal, I., Wang, X., Bastiani, M.J., Ganfornina, M.D. (2006) Loss of glial lazarrillo, a homolog of apolipoprotein D, reduces lifespan and stress resistance in *Drosophila*. *Curr Biol* **16**: 680-686
- Sánchez-Alonso, J.A., López-Aparicio, P., Recio, M.N., Pérez-Albarsanz, M.A. (2003) Apoptosis-mediated neurotoxic potential of a planar (PCB 77) and a nonplanar (PCB 153) polychlorinated biphenyl congeners in neuronal cell cultures. *Toxicol Lett* **144**: 337-349
- Sanjuán, A., Comesaña, A. S., De Carlos, A. (1996) Macrogeographic differentiation by mtDNA restriction site analysis in the SW European *Mytilus galloprovincialis*. *J Exp Mar Biol Ecol* **198**: 89-100
- Sanjuán, A., Quesada, H., Zapata, C., Álvarez, G. (1990) On the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. On the NW coast of the Iberian Peninsula. *J Exp Mar Biol Ecol* **143**: 1-14
- Sassi, D., Kletsas, D., Ottaviani, E. (1998) Interactions of signalling pathways in (1-24)-induced cell shape changes in invertebrate immunocytes. *Peptides* **19**: 1105-1110
- Satoh, H., Oshiro, N., Iwanaga, S., Namikoshi, M., Nagai, H. (2007) Characterization of PsTX-60B, a new membrane-attack complex/perforin (MACPF) family toxin, from the venomous sea anemone *Phyllodiscus semoni*. *Toxicon* **49**: 1208-1210
- Savill, J. y Fadok, V. (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**(6805): 784-788
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M. y colaboradores. (1998) Two CD95 (APO-1/ Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17**: 1675-1687
- Scarpato, A., Romanelli, G., Galgani, F., Andral, B., Amici, M., Giordano, P., Caixach, J. y colaboradores. (2010) Western Mediterranean coastal waters-Monitoring PCBs and pesticides accumulation in *Mytilus galloprovincialis* by active mussel watching: the Mytilos project. *J Environ Monitor* **12**(4): 924-935
- Schaeffer, H.T. y Weber, M.J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**: 2435-2444
- Schwartzman, R.A. y Cidlowski, J.A. (1993) Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* **14**: 133-151
- Shaham, S. y Horvitz, H.R. (1996) An alternatively spliced *C. elegans* ced-4 RNA encodes a novel cell death inhibitor. *Cell* **86**(2): 201-208
- Sharma, S., Singh, R., Rana, S. (2011) Bioactive peptides: a review. *Int J Bioautomation* **15**(4): 223-250
- Shi, Y. (2004) Caspase activation, inhibition and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* **13**(8): 1979-1987
- Shibue, T. y Taniguchi, T. (2006) BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int J Cancer* **119**: 2036-2043

-
- Shimizu, S., Narita, M., Tsujimoto, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome C by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**: 483-487
- Shin, K.J., Bae, S.S., Hwang, Y.A., Seo, J.K., Ryu, S.H., Suh, P.G. (2000) 2,2,4,6,6-pentachlorobiphenyl induces apoptosis in human monocytic cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **169**: 1-7
- Shinkai, Y., Takio, K., Okumura, K. (1988) Homology of perforin to the ninth component of complement (C9). *Nature* **334**: 525-527
- Sigrist, C.J.A., Cerutti, L., de Castro, E., Langendijk-Genevaux, P.S., Bulliard, V., Bairoch, A., Hulo, N. (2010) PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res* **38**: 161-166
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F. (2000) Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* **5**: 415-418
- Sindermann, C.J. (1990) Principal disease of marine fish and shellfish **1**. Academic Press. New York (U.S.A)
- Singh, N.P. (2000) A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Exp Cell Res* **256**: 328-337
- Skulachev, V.P. (2002) Programmed death in yeast as adaptation? *FEBS Lett* **528**(1-3): 23-26
- Slade, D.J., Lovelace, L.L., Chruszcz, M., Minor, W., Lebioda, L., Sodetz, J.M. (2008) Crystal structure of the MACPF domain of human complement protein C8 alpha in complex with the C8 gamma subunit. *J Mol Biol* **379**: 331-342
- Slim, R., Toborek, M., Robertson, L.W., Lehmler, H.J., Hennig, B. (2000) Cellular glutathione status modulates polychlorinated biphenyl-induced stress response an apoptosis in vascular endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **166**: 36-42
- Smolarz, K., Wołowicz, M., Stachnik, M. (2006) First record of the occurrence of "gill disease" in *Mytilus edulis trossulus* from the Gulf of Gdańsk (Baltic Sea, Poland). *J Invertebr Pathol* **93**(3): 207-209
- Snape, J.R, Maund, S., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H. (2004) Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquat Toxicol* **67**: 143-154
- Söderhall, K. y Smith V.J. (1986) The prophenoloxidase activating system: the biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity, with special reference to crustaceans. Págs: 208-223 en: Immunity in invertebrates. Proceedings in Life Sciences. Springer Verlag
- Sodetz, J.M., y Plumb, M.E. (2001) Complement: terminal pathway. *Encyclopedia of Live Science*. Nature Publishing Group: 1-6
- Sohn, D., Graupner, V., Neise, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K., Jänicke, R.U. (2009) Pifithrin- α protects against DNA damage-induced apoptosis downstream of mitochondria independent of p53. *Cell Death Differ* **16**: 869-878

- Sokolova, I.M. (2009) Apoptosis in molluscan immune defense. *Inv Survival J* **6**: 49-58
- Sokolova, I.M., Evans, S., Hughes., F.M. (2004) Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition. *J Exp Biol* **207**: 3369-3380
- Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E., Levine, A. (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* **11**(3): 431-444
- Song, L., Wang, L., Qiu, L., Zhang, H. (2010) Bivalve immunity. Págs: 44-65 en: Söderhäll, K. Chapter 3. Invertebrate Immunity. Landes Bioscience and Springer Science Business Media
- Song, S., Xing, D., Zhou, F.F., Chen, W.R. (2009) PDT-treated apoptotic cells induce macrophage synthesis NO. International Conference on Optical Instruments and Technology: optical trapping and microscopic imaging. *Proc of SPIE* **7505**: 1-10
- Speidel, D. (2009) Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol* **20**(1): 14-24
- Sperstad, S.V., Haug, T., Blenche, H.M., Styrvold, O.B., Li, C., Stensvåg, K. (2011) Antimicrobial peptides from marine invertebrates: challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. *Biotechnol Adv* **29**(5): 519-530
- Spilsbury, K., O'Mara, M.A., Wu, W.M., Rowe, P.B., Symonds, G.Y., Takayama, Y. (1995) Isolation of a novel macrophage-specific gene by differential ADNc analysis. *Blood* **85**: 1620-1629
- Srivastava, M., Scherr, H., Lackey, M., Xu, D., Chen, Z., Lu, J., Bergmann, A. (2007) ARK the Apaf-1 related killer in Drosophila, requires diverse domains for its apoptotic activity. *Cell Death Differ* **14**(1): 92-102
- St.-Jean, S.D., Stephens, R.E., Courtenay, S.C. Reinisch, C.L. (2005) Detecting p53 family proteins in haemocytic leukemia cells of *Mytilus edulis* from Pictou Harbour, NovaScotia, Canada. *JFAS* **62**(9): 2055-2066
- Steele, A.J., Prentice, A.G., Hoffbrand, A.V., Yogashangary, B.C., Hart, S.M., Nacheva, E.P., Howard-Reeves, J.D. y colaboradores. (2011) P53-mediated apoptosis of CLL cells: evidence for a transcription-independent mechanism. *Blood* **112**(9): 3827-3834
- Stefano, G.B., Leung, M.K., Zhao, X., Scharrer, B. (1989) Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes. *Proc Natl Aca Sci USA* **86**: 626-630
- Steinert, J.R., Chernova, T., Forsythe, I.D. (2010) Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist* **16**(4): 435-452
- Stennicke, H.R. y Salvesen, G.S (1999) Caspases: preparation and characterization. *Methods* **17**(4): 313-319
- Stepp, S.E., Dufourcq-Lagelouse, R., Le Deist, F., Bhawan, S., Certain, S., Mathew, P.A., Henter, J.I. y colaboradores. (1999) Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science* **286**: 1957-1959

-
- Stevens, L.M., Frohnhoffer, H.G., Klingler, M., Nüsslein-Volhard, C. (1990) Localized requirement for torso-like expression in follicle cells for development of terminal Anlagen of the *Drosophila* embryo. *Nature* **346**: 660-663
- Štifanić, M., Mičić, M., Ramšak, A., Blašković, S., Ruso, A., Zahn, R.K., Batel, R. (2009) P63 in *Mytilus galloprovincialis* and p53 family members in the phylum Mollusca. *Comp Biochem Physiol Part B* **154**: 264-273
- Stoka, V., Turk, V., Turk, B. (2007) Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis. *Biol Chem* **388**: 555-560
- Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V.M. (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* **69**: 217-245
- Suárez, M.P., Álvarez, C., Molist, P., SanJuan, F. (2005) Particular aspects of gonadal cycle and seasonal distribution of gametogenic stages of *Mytilus galloprovincialis* in the estuary of Vigo. *J Shellfish Res* **24**: 531-540
- Sullivan, J.C., Ryan, J.F., Watson, J.A., Webb, J., Mullikin, J.C., Rokhsar, D., Finnerty, J.R. (2006) StellaBase: the *Nematostella vectensis* genomics database. *Nucleic Acids Res* **34**: 495-499
- Sunila, I. y LaBanca, J. (2003) Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Dis Aquat Organ* **56**: 163-170
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J. y colaboradores. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**(6718): 441-446
- Suzuki, M.M., Satoh, N., Nonaka, M. (2002) C6-like and C3-like molecules from the cephalochordate, amphioxus, suggest a cytolytic complement system in invertebrates. *J Mol Evol* **54**: 671-679
- Suzuki, T., Takagi, T., Furukohri, T., Kawamura, K., Nakauchi, M. (1990) A calcium-dependent galactose-binding lectin from the tunicate *Polyandrocarpa misakiensis*. Isolation, characterization, and amino acid sequence. *J. Biol Chem* **265**: 1274-1281
- Tafalla, C., Gómez-León, J., Novoa, B., Figueras, A. (2003) Nitric oxide production by carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) hemocytes. *Dev Comp Immunol* **27**(3): 197-205
- Tafalla, C., Novoa, B., Figueras, A. (2002) Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **132**(2): 423-431
- Tait, S.W. y Green, D.R. (2008) Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* **27**(50): 6452-6461
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596-1599
- Tanguy, A., Guo, X., Ford, S.E. (2004) Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters. *Gene* **338**: 121-131

- Tassanakajon, A., Vatanavicharn, T., Supungul, P., Tang, S., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., Tharntada, S. y colaboradores. (2008) Bio/technology of marine invertebrates: recent advances in shrimp and shellfish. Págs: 221-239 en: 5th World Fisheries Congress. Tsukamoto, K., Kawamura, T., Takeuchi, T., Beard, T.D., Kaiser, M.J. (eds). Fisheries for Global Welfare and Environment
- Terahara, K., y Takahashi, K. (2008) Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs. *Curr Pharm Design* **14**: 131-137
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K. y colaboradores. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature (London)* **356**: 768-774
- Tirado, C., Macías, J.C., Villarías, R.M., Gaiteiro, J.M., Gómez, D., Martín, M.J., Rueda, J.L. y colaboradores. (2005) Conclusiones derivadas del estudio sobre el potencial del cultivo de mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 en Andalucía. *Bol Inst Esp Oceanogr* **21**(1-4): 455-464
- Tirapé, A., Bacque, C., Brizard, R., Vandenbulcke, F., Boulo, V. (2007) Expression of immune-related genes in the oyster *Crassostrea gigas* during ontogenesis. *Dev Comp Immunol* **31**: 859-873
- Tiscar, P.G., y Mosca, F. (2004) Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Vet Res Commun* **28**: 57-62
- Tittel, J.N., y Steller, H. (2000) A comparison of programmed cell death between species. *Genome Biol* **1**: 1-6
- Tomanek, L. y Zuzow, M. (2010) The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress. *J Exp Biol* **213**(Pt 20):3559-74. doi: 10.1242/jeb.041228
- Torreilles, J. y Romestand, B. (2001) *In vitro* production of peroxynitrite by haemocytes from marine bivalves: C-ELISA determination of 3-nitrotyrosine level in plasma proteins from *Mytilus galloprovincialis* and *Crassostrea gigas*. *BMC Immunol* **2**: 1
- Torreilles, J., Guerin, M.C., Roch, P. (1996) Espèces oxygénées réactives et systèmes de défense des bivalves marins. *C.R. Acad Sci Paris* **319**: 209-218
- Trapani, J., y Smyth, M.J. (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunol* **2**: 735-747
- Tripp, M.R. (1961) The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Australorbis glabratus*. *J. Parasitology* **47**: 745-751
- Tripp, M.R. (1992a) Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *J Invertebr Pathol* **59**: 222-227
- Tsai, J., Jain, M., Hsieh, C., Lee, W., Yoshizumi, M., Patterson, C., Perrella, M.A. y colaboradores. (1996) Induction of apoptosis by pyrrolidinedithiocarbamate and N-acetylcysteine in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **271**(7): 3667-3670

-
- Tschopp, J., Masson, D., Stanley, K.K. (1986) Structural/functional similarity between proteins involved in complement-and cytotoxic T-lymphocytes-mediated cytolysis. *Nature* **322**: 831-834
- Tschopp, J., Podack, E.R., Müller-Eberhard, H.J. (1982) Formation of transmembrane tubules by spontaneous polymerization of the hydrophilic complement protein C9. *Nature* **298**: 534-538
- Tschopp, J., Schäfer, S., Masson, D., Peitsch, M.C., Heusser, C. (1989) Phosphorylcholine acts as a Ca(2+)-dependent receptor molecule for lymphocyte perforin. *Nature* **337**: 272-274
- Tsujimoto, Y. y Shimizu, S. (2000) VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* **7**(12): 1174-1181
- Tubiash, H.S. y Otto, S.V. (1986) Bacterial problems in oysters. A review. Págs: 233-242 en *Pathology in Marine Aquaculture 9*. Vivarès, C.P., Bonami, J.R., Jasper, E. (eds). Bredene, Belgium, European Aquaculture Society, Spec. Publ
- Tubiash, H.S., Chanley, P.E., Leifson, E. (1965) Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. Etiology and epizootiology. *J Bacteriol* **90**: 1036-1044
- Turk, B., Turk, D., Salvesen, G.S. (2002) Regulating cysteine protease activity: essential role ofprotease inhibitors as guardians and regulators. *Curr Pharma Des* **8**: 1623-1637
- Turk, B., Turk, D., Turk, V. (2000) Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* **1477**(1-2): 98-111
- Turk, V., Turk, B., Turk, D. (2001) Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBOJ* **20**: 4629-4633
- Turner, J.W., Good, B., Cole, D., Lipp, E.K. (2009) Plankton composition and environmental factors contribute to *Vibrio* seasonality. *ISME J* **3**: 1082-1092
- Tweten, R. 2005. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infect Immun* **73**(10): 6199-6209
- Uellner, R., Zvelebil, M.J., Hopkins, J., Jones, J., MacDougall, L.K., Morgan, B.P., Podack, E. y colaboradores. (1997) Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *EMBO J* **16**(24): 7287-7296
- Uren, R.T., Dewson, G., Chen, L., Coyne, S.C., Huang, D.C., Adams, J.M., Kluck, R.M. (2007) Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple prosurvival Bcl-2 relatives, not Bak. *J Cell Biol* **177**: 277-287
- Urrea-Moreno, R., Gil, J., Rodriguez-Sainz, C., Cela, E., LaFay, V., Oloizia, B., Herr, A.B. y colaboradores. (2009) Functional assessment of perforin C2 domain mutations illustrates the critical role for calcium-dependent lipid binding in perforin cytotoxic function. *Blood* **113**: 338-346
- Van den Broek, M.F. y Hengartner, H. (2000) The role of perforin in infections and tumour surveillance. *Exp Physiol* **85**: 681-685

- Van Loo, G., Schotte, P., Van Gurp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I. y colaboradores. (2001) Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* **8**(12): 1136-1142
- Van Noorden, C.J. (2001) The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem* **103**: 241-251
- Varkey, J., Chen, P., Jemmerson, R., Abrams, J.M. (1999) Altered cytochrome C display precedes apoptotic cell death in *Drosophila*. *J Cell Biol* **144**(4): 701-710
- Vasta, G.R. (2009) Roles of galectins in infection. *Nat Rev Microbiol* **7**(6): 424-438
- Vaux, D.L. y Korsmeyer, S.J. (1999) Cell death in development. *Cell* **96**: 245-254
- Vaux, D.L., Cory, S., Adams, J.M. (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**(6189): 440-442
- Velentzas, A.D., Nezis, I.P., Stravopodis, D.J., Papassideri, I.S., Margaritis, L.H. (2007) Apoptosis and autophagy function cooperatively for the efficacious execution of programmed cell death during *Drosophila virilis* oogenesis. *Autophagy* **3**(2): 130-132
- Venier, P., De Pittà, C., Bernante, F., Varotto, L., De Nardi, B., Bovo, G., Roch, P. y colaboradores. (2009) MytiBase: a knowledge base of mussel (*M. galloprovincialis*) transcribed sequences. *BMC Genomics* **10**: 72
- Venier, P., De Pittà, C., Pallavicini, A., Marsano, F., Varotto, L., Romualdi, C., Dondero, F. y colaboradores. (2006) Development of mussel mRNA profiling: Can gene expression trends reveal coastal water pollution? *Mutat Res* **602**: 121-134
- Venier, P., Varotto, L., Rosani, U., Millino, C., Celegato, B., Bernante, F., Lanfranchi, G. y colaboradores. (2011) Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics* **12**: 69
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L. y colaboradores. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**(1): 43-53
- Vernooy, S.Y., Copeland, J., Ghaboosi, N., Griffin, E.E., Yoo, S.J., Hay, B.A. (2000) Cell death regulation in *Drosophila*: conservation of mechanism and unique insights. *J Cell Biol* **150**: 69-76
- Vezzulli, L., Brettar, I., Pezzati, E., Reid, P.C., Colwell, R.R., Höfle, M.G., Pruzzo, C. (2012) Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the vibrios. *The ISME Journal* **6**: 21-30
- Vezzulli, L., Previati, M., Pruzzo, C., Marchese, A., Bourne, D.G., Cerrano, C. (2010) *Vibrio* infections triggering mass mortality events in a warming Mediterranean Sea. *Environ Microbiol* **12**: 2007-2019
- Villalba, A. (1995) Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture* **130**: 269-277

-
- Villalba, A., Mourelle, S.G., Carballal, M.J., López, C. (1997) Symbionts and diseases of farmed mussels *Mytilus galloprovincialis* throughout the culture process in the Rias of Galicia (NW Spain). *Dis Aquat Org* **31**: 127-139
- Villalba, A., Reece, K.S., Ordás, M.C., Casas, S.M., Figueras, A. (2004) Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquat Liv Res* **17**: 411-432
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature* **408**(6810): 307-310
- Voskoboinik, I., Smyth, M.J., Trapani, J.A. (2006) Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* **6**: 940-952
- Voskoboinik, I., Sutton, V.R., Ciccone, A., House, C.M., Chia, J., Darcy, P.K., Yagita, H. (2007) Perforin activity and immune homeostasis: The common A91V polymorphism in perforin results in both presynaptic and postsynaptic defects infunction. *Blood* **110**: 1184-1190
- Voskoboinik, I., Thia, M.C., De Bono, A., Browne, K., Cretney, E., Jackson, J.T., Darcy, P.K. (2004) The functional basis for hemophagocytic lymphohistiocytosis in a patient with co-inherited missense mutations in the perforin (PFN1) *J Exp Med* **200**: 811-816
- Voskoboinik, I., Thia, M.C., Fletcher, J., Ciccone, A., Brovne, K., Smyth, M., Trapani, J.A. (2005) Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: a critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem* **280**: 8426-8434
- Vousden, K.H. y Prives, C. (2009) Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* **137**: 413-431
- Vrijenhoek, T., Buizer-Voskamp, J.E., Van der Stelt, I., Strengman, E., Sabatti, C., Geurts, Van Kessel, A. y colaboradores. (2008) Recurrent CNVs disrupt three candidate genes in schizophrenia patients. *Am J Hum Genet* **83**: 504-510
- Waechter, M., Poubalanne, S., Chollet, B., Nicolas, J.L., Berthe, F. (2002) Comparative analysis of *Vibrio splendidus*-related strains isolated during *Crassostrea gigas* mortality events. *Aquat Living Resour* **15**: 251-258
- Walker, C.W., Van Beneden, R.J., Muttray, A.F., Bottger, S.A., Kelley, M.L., Tucker, A.E., Thomas, W.K. (2011) p53 superfamily proteins in marine bivalve cancer and stress biology. *Adv Mar Biol* **59**: 1-36
- Walker, X.W y Levine, A.J. (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *PNAS* **93**: 15335-15340
- Walsh, C.M. y Edinger, A.L. (2010) The complex interplay between autophagy, apoptosis and necrotic signals promotes T-cell homeostasis. *Immunol Rev* **236**: 95-109
- Walter, D.H., Haendeler, J., Galle, J., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. (1998) Cyclosporin A inhibits apoptosis of human endothelial cells by preventing release of cytochrome C from mitochondria. *Circulation* **98**: 1153-1157
- Wang, G.D., Zhang, K.F., Zhang, Z.P., Zou, Z.H., Jia, X.W., Wang, S.H., Lin, P. y colaboradores. (2008) Molecular cloning and responsive expression of

- macrophage expressed gene from small abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. Fish Shellfish Immunol **24**: 346-359
- Wang, L., Miura, M., Bergeron, L., Zhu, H., Yuan, J. (1994) Ich-1 and Ice/ced-3 related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. Cell **78**: 739-750
- Wang, L., Zhi, B., Wu, W.L., Zhang, X.B. (2008) Requirement for shrimp caspase in apoptosis against virus infection. Dev Comp Immunol **32**: 706-715
- Wang, X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes Dev **15**(22): 2922-2933
- Wang, X.Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, E. M., Kuroda, M., Ron, D. (1998) Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. EMBO J **17**: 5708-5717
- Watermann, B.T., Herlyn, M., Daehne, B., Bergmann, S., Meemken, M., Kolodzey, H. (2008) Pathology and mass mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in 2005 at the East Frisian coast, Germany. J Fish Dis **31**(8): 621-630
- Weber, C.H. y Vincenz, C. (2001) The death domain superfamily: a tale of two interfaces? Trends Biochem Sci **26**: 475-481
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A. y colaboradores. (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. Science **292** (5517): 727-730
- Wei, X., Yang, J., Liu, X., Yang, D., Xu, J., Fang, J., Wang, W. y colaboradores. (2012b) Identification and transcriptional analysis of two types of lectins (SgCTL-1 and SgGal-1) from mollusk *Solen grandis*. Fish Shellfish Immunol **33**: 204-212
- Wei, X., Yang, J., Yang, D., Xu, J., Liu, X., Yang, J., Fang, J. y colaboradores. (2012a) Molecular cloning and mRNA expression of two peptidoglycan recognition protein (PGRP) genes from mollusk *Solen grandis*. Fish Shellfish Immunol **32**: 178-185
- Weill, M., Philips, A., Chourrout, D., Fort, P. (2005) The caspase family in urochordates: distinct evolutionary fates in ascidians and larvaceans. Biol Cell **97**(11): 857-866
- White, K., Grether, M.E., Abrams, J.M., Young, L., Farrell, K., Steller, H. (1994) Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. Science **264**(5159): 677-683
- White, R.J.K.K. (2009) Inside an enigma: do mitochondria contribute to cell death in *Drosophila*? Apoptosis **14**: 961-968
- Widlak, P. y Garrard, W.T. (2009) Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor in biology and disease. Cell Mol Life Sci **66**: 263-274
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L. (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiol Rev **79**(1): 143-180

-
- Wiens, M., Diehl-Seifert, B., Müller, W.E. (2001) Sponge Bcl-2 homologous protein (BHP2-GC) confers distinct stress resistance to human HEK-293 cells. *Cell Death Differ* **8**: 887-898
- Wiens, M., Korzhev, M., Krasko, A., Thakur, N.L., Perovic-Ottstadt, S., Breter, H.J., Ushijima, H. y colaboradores. (2005) Innate immune defense of the sponge *Suberites domuncula* against bacteria involves a MyD88-dependent signaling pathway. Induction of a perforin-like molecule. *J Biol Chem* **280**: 27949-27959
- Wiens, M., Krasko, A., Perovic, S., Müller, W.E.G. (2003) Caspase-mediated apoptosis in sponges: cloning and function of the phylogenetic oldest apoptotic proteases from Metazoa. *Biochim Biophys Acta* **1593**: 179-189
- Williams, T., Chitnis, N.S., Bilimoria, S.L. (2009) Invertebrate *Iridovirus* modulation of apoptosis. *Virol Sin* **24**: 295-304
- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M. y colaboradores. (2005) Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* **19**(11): 1294-1305
- Wilson, K.P., Black, J.A., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A. y colaboradores. (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**: 270-275
- Wilson, P.M., Fryer, R.H., Fang, Y., Hatten, M.E. (2010) Astn2, a novel member of the astrotactin gene family, regulates the trafficking of ASTN1 during glial-guided neuronal migration. *J Neurosci* **30**(25): 8529-8540
- Wolbers, F., Buijtenhuijs, P., Haanen, C., Vermes, I. (2004) Apoptotic cell death kinetics *in vitro* depend on the cell types and the inducers used. *Apoptosis* **9**: 385-392
- Wolf, Y.I., Aravind, L., Koonin, E.V. (1999) Rickettsiae and Chlamydiae: evidence of horizontal gene transfer and gene exchange. *Trends Genet* **15**: 173-175
- Wood, D.E. y Newcomb, E.W. (1999) Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* **274**(12): 8309-8315
- Wooster, W.S., Bakun, A., McLain, D.R. (1976) The seasonal upwelling cycle along the eastern boundary of the North Atlantic. *J Mar Res* **34**: 131-141
- Wootton, E.C., Dyrinda, E.A., Pipe, R.K., Ratcliffe, N.A. (2003) Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve molluscs. *Aquat Toxicol* **65**: 13-25
- Wright, K.O., Messing, E.M., Reeder, J.E. (2004) DBCCR1 mediates death in cultured bladder tumor cells. *Oncogene* **23**: 82-90
- Wu, C., Zhang, W., Sun, Z., Li, P. (2008) Molecular evolution of Cide family proteins: novel domain formation in early vertebrates and the subsequent divergence. *BMC Evol Biol* **8**: 159
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**: 251-306

- Xu, D., Li, Y., Arcaro, M., Lackey, M., Bergmann, A. (2005) The CARD-carrying caspase Dronc is essential for most, but not all, developmental cell death in *Drosophila*. *Development* **132**: 2125-2134
- Xu, Q., y Reed, J.C. (1998) Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* **1**: 337-346
- Yamaura, K., Takahashi, K.G., Suzuki, T. (2008) Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **149**: 168-175
- Yang, J., Qiu, L., Wang, L., Huang, M., Wang, L., Zhang, H., Song, L. (2011) A TRAF and TNF receptor-associated protein (TTRAP) in mollusk with endonuclease activity. *Dev Comp Immunol* **35**(8): 827-834
- Yang, S. y Wu, X. (2010) Identification and functional characterization of a human sTRAIL homolog, CasTRAIL, in an invertebrate oyster *Crassostrea ariakensis*. *Dev Comp Immunol* **34**(5): 538-545
- Yaoita, Y. y Nakajima, J. (1997) Induction of apoptosis and CPP32 expression by thyroid hormone in a myoblastic cell line derived from tadpole tail. **272**(8): 5122-5127
- Yeretssian, G., Labbe, K., Saleh, M. (2008) Molecular regulation of inflammation and cell death. *Cytokine* **43**: 380-390
- Yoo, B.S., Jung, K.H., Hana, S.B., Kim, H.M. (1997) Apoptosis mediated immunotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs) in murine splenocytes. *Toxicol Lett* **91**: 83-89
- Yoshino, T.P. y Cheng, T.C. (1976) Fine structural localization of acid phosphatase in granulocytes of the pelecypod *Mercenaria mercenaria*. *Trans Am Microsc Sot* **95**: 215-220
- Yoshino, T.P. y Granath, W.O. (1983) Identification of antigenically distinct hemocyte subpopulations in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane markets. *Cell Tissue Res* **232**: 553-564
- Youn, B.S., Liu, C.C., Kim, K.K., Young, J.D., Kwon, M.H., Kwon, B.S. (1991) Structure of the mouse pore-forming protein (perforin) gene: analysis of transcription initiation site, 5' flanking sequence, and alternative splicing of 5' untranslated regions. *J Exp Med* **173**(4): 813-822
- Young, J.D., Damiano, A., DiNome, M.A., Leong, L.G., Cohn, Z.A. (1987) Dissociation of membrane binding and lytic activities of the lymphocyte poreforming protein (perforin). *J Exp Med* **165**: 1371-1382
- Yu, X.Q. y Kanost, M.R. (2000) Immulectin-2, a lipopolysaccharide-specific lectin from an insect, *Manduca sexta*, is induced in response to Gram-negative bacteria. *J Biol Chem* **275**: 37373-37381
- Yu, X.Q., Gan, H., Kanost, M.R. (1999) Immulectin, an inducible C-type lectin from an insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect Biochem Mol Biol* **29**: 585-597

-
- Yu, X.Q., Tracy, M.E., Ling, E., Scholz, F.R., Trenczek, T. (2005) A novel C-type immulectin-3 from *Manduca sexta* is translocated from hemolymph into the cytoplasm of hemocytes. *Insect Biochem Mol Biol* **35**: 285-295
- Yu, Y., Qiu, L., Song, L., Zhao, J., Ni, D., Zhang, Y., Xu, W. (2007) Molecular cloning and characterization of a putative lipopolysaccharide-induced TNF-[alpha] factor (LITAF) gene homologue from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Fish Shellfish Immunol* **23**: 419-429
- Yuan, J. y Horvitz, H.R. (1992) The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* **116**: 309-320
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., Horvitz, H. R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**: 641-652
- Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J., Ahmad, M. (2003) Review: molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *CMLS* **60**: 6-20
- Zhang, D., Jiang, J., Jiang, S., Ma, J., Su, T., Qiu, L., Zhu, C. y colaboradores. (2009) Molecular characterization and expression analysis of a putative LPS-induced TNF-[alpha] factor (LITAF) from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol* **27**: 391-396
- Zhang, D., Lu, C., Whiteman, M., Chance, B., Armstrong, J. (2008) The mitochondrial permeability transition regulates cytochrome C release for apoptosis during endoplasmic reticulum stress by remodeling the crista junction. *J Biol Chem* **283**(6): 3476-3486
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P. y colaboradores. (2012) The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **1**: 1-6
- Zhang, J., Pan, M., Sun, Z., Huang, S., Yu, Z., Liu, D., Zhao, D. y colaboradores. (2010) The genomic underpinnings of apoptosis in the silkworm, *Bombix mori*. *BMC Genomics* **11**: 611
- Zhang, L., Li, L., Zhang, G. (2011) Gene discovery, comparative analysis and expression profile reveal the complexity of the *Crassostrea gigas* apoptosis system. *Dev Comp Immunol* **35**: 603-610
- Zhang, M., Liu, W., Ding, D., Salvi, R. (2003) Pifithrin- α suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. *Neuroscience* **120**: 191-205
- Zhao, L. y Ackermann, S.L. (2006) Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 444-452
- Zheng, C., Heintz, N., Hatten, M.E. (1996) CNS gene encoding astrotactin, which supports neuronal migration along glial fibers. *Science* **272**: 417-419
- Zheng, T.S., Schlosser, S.F., Dao, T., Hingorani, R., Crispe, I.N., Boyer, J.L., Flavell, R.A. (1998) Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events

- associated with Fas mediated apoptosis *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA **95**:13618-13623
- Zhivotovsky, B., y Orrenius, S. (2005) Caspase-2 function in response to ADN damage. Biochem Bioph Res Co **331**: 859-867
- Zhu, B. y Wu, X. (2008) Identification of outer membrane protein ompR from rickettsia-like organism and induction of immune response in *Crassostrea ariakensis*. Mol Immunol **45**: 3198-3204
- Zorita, I., Apraiz, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Orbea, A., Cancio, I., Soto, M., Marigómez, I. y colaboradores. (2007) Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean sea using mussels as sentinel organisms. Environ Pollut **148**: 236-250

Agradecimientos

La presente tesis es el resultado de más de tres años y medio de esfuerzo y continuo trabajo. Durante este periodo he conocido a personas que han realizado grandes aportaciones a este proyecto. Me refiero no sólo a contribuciones de carácter científico o formativo sino también a aportaciones implícitas en forma de consejos, transmisión de experiencias propias e ideas personales. Todo ello ha ayudado a mejorar la calidad de este trabajo y más aún, a contagiarme optimismo y seguridad en todas las tareas realizadas a lo largo de esta tesis.

Entre las personas a las que quiero dedicar unas líneas, se encuentra el Profesor D. Antonio Figueras Huerta, quien me ha brindado la oportunidad de llevar a cabo este trabajo en su laboratorio y bajo su dirección. Sin su propuesta, apoyo e impulso este trabajo sería inexistente. Asimismo, agradecer a la Doctora Dña. Beatriz Novoa García, por haberme animado a iniciar el desarrollo de la tesis y haber prestado su ayuda, colaboración y participación en todas las fases de este trabajo.

Al Doctor D. Alejandro Romero Jódar, co-director de esta tesis y a quién doy mi más sincero agradecimiento por los ánimos y fiel voto de confianza depositado en mí antes y durante la realización de este trabajo. Del mismo modo, agradecer su ayuda en el diseño, puesta en marcha, y desarrollo de cada uno de los experimentos realizados. Gracias por haber inculcado su <<saber hacer>> científico y haberme iniciado en la "doctrina apoptótica". Deseo que ésta, su primera tesis dirigida, sea sólo el comienzo de una gran carrera investigadora llena de grandes logros y éxito profesional.

Agradecer al Profesor D. José Luis Soengas Fernández el haber aceptado la tutela de este proyecto de Tesis Doctoral. Del mismo modo, darle las gracias por su enorme implicación y colaboración durante los trámites administrativos relativos al Programa de Doctorado de Acuicultura y la estancia de movilidad para estudiantes matriculados en Programas de Doctorado con Mención hacia la Excelencia del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Gracias a la Profesora Dña. Carla Pruzzo por haberme brindado la oportunidad de disfrutar de la estancia de movilidad en el laboratorio de Microbiología dell'Università degli Studi di Genova (Italia). Transmitirle mi más sincero

agradecimiento por la calurosa acogida recibida tanto por su parte como por la del resto de miembros del laboratorio. *Grazie*.

Es momento de dar un pequeño homenaje a todos los compañeros del Departamento de Inmunología y Genómica, tanto a los que ya no están como a los que siguen ahí. De todos he aprendido algo y del mismo modo espero haber transmitido una parte de mí a cada uno de ellos. Les agradezco su atención, disponibilidad y ayuda. En especial, me gustaría dedicar unas palabras a Rubén Chamorro, Técnico de Mantenimiento y Gestión de Acuarios. Agradecerle su asistencia técnica durante la ejecución de los experimentos llevados a cabo y en las tareas de obtención de puestas de mejillón, control y mantenimiento de las mismas, seguimiento del desarrollo larvario, entre muchas otras. Gracias por su sincera, incondicional y desinteresada ayuda. A la Auxiliar de laboratorio, Begoña Villaverde, quién puede presumir de poseer una gran fuerza interior, comprensión y extremada sensatez; agradecerle el tiempo que ha dedicado a escucharme y como no, a aconsejarme. A mis compañeras de despacho: Rebeca Moreira, Patricia Pereiro y Mónica Varela, agradecerles su ayuda y compañía durante todo este tiempo.

Al resto de compañeros del Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo, en especial a Waldo y Javier, pero también a Sheila, Alhambra, Miguel, Sonia, Mar y Aldo. Gracias por los maravillosos momentos que hemos pasado juntos durante este tiempo. Porque todavía nos quedan muchas pistas que patinar, muchos senderos que recorrer y muchos atardeceres que disfrutar bajo la red de vóley-playa. Ha sido estupendo el tiempo dedicado al “aprendizaje” deportivo y como no al ocio. Nos ha servido para establecer además de una amistad, una relación de confidencialidad y compañerismo.

A mis compañeros del Área de Tecnología de los Productos Pesqueros del Centro Tecnológico del Mar-Fundación CETMAR: Elvira Abollo, Pilar Sieiro y Uxía Vázquez, a las compañeras de Cooperación Internacional, a mis compañeros de despacho Helena Rodríguez, Miguel Bao y Rubén Rodríguez, y muy especialmente a D. Julio Maroto: gracias por su continuo interés, preocupación permanente y por todos los consejos que me han hecho llegar para que la conclusión de esta tesis se alcanzase de manera satisfactoria. Sin todo ello, el desarrollo de la fase final de este trabajo hubiese sido más arduo, tedioso y complicado.

Agradezco a mi familia, en especial a mis padres, el haber estado siempre ahí y en todo momento. A mi hermana por su orgullo crónico de hermana mayor y por

ejerger su papel preferido: el de hermana mayor. Gracias a mi abuela por enseñarme a hacer las cosas "con amor". Sus casi 99 años constituyen un símbolo de energía, fortaleza y tesón para todos los que la rodean. Para que sigamos disfrutando de ella durante mucho más tiempo.

Gracias a Piero, *perché mi hai insegnato a crescere, a non preoccuparmi per le cose banali, a lavorare forte ogni giorno e a non arrendermi mai. Ovunque sia, ti sento sempre, sempre, sempre accanto. Grazie.*

Gracias a todos los que dedicásteis un minuto de vuestro tiempo a escucharme y me aconsejásteis con la mayor sencillez y veracidad. Este trabajo va dedicado a todos vosotros.

Gracias

