



XENOMAR

Departamento de Bioloxía Celular e Molecular
Área de Xenética

Transcriptómica en *Mytilus galloprovincialis*: Validación de xenes expresados diferencialmente fronte á toxina ácido okadaico

Traballo de Fin de Grao presentado por

Sabela Rodríguez Lorenzo

para optar ao Grao en Bioloxía.

Directora:

Dra. Josefina Méndez Felpeto

2014

Resumo

O ácido okadaico atópase entre as toxinas mariñas máis abundantes en Galicia, tendo a capacidade de producir periodicamente a síndrome gastrointestinal *Diarrhetic Shellfish Poisoning* tras o consumo de moluscos bivalvos contaminados. Este traballo avalía a expresión diferencial dos xenes *citocromo oxidasa subunidades II e III*, *caspasa 3 7-3*, *p53*, *citocromo P450* e *heat shock protein 70* na branquia do mexillón *Mytilus galloprovincialis* en tempos curtos de exposición á toxina ácido okadaico coa finalidade de obter biomarcadores de contaminación temperá. Os mexillóns tratados foron divididos en dous grupos e alimentáronse con cultivos da microalga productora de ácido okadaico *Prorocentrum lima* a concentracións de 200 e 20000 células/mL. Os resultados mostran a sobreexpresión do xene *citocromo P450* a ambas as concentracións, confirmando o seu potencial como biomarcador de resposta a ácido okadaico. O xene *caspasa 3 7-3* aparece sobreexpresado unicamente a 200 cél/mL, polo que é preciso profundizar no seu estudo.

Índice xeral

1. Introducción	1
<i>Harmful Algal Blooms</i>	
Ácido Okadaico (AO)	
Monitorización do ácido okadaico	
Transcriptómica en moluscos bivalvos	
2. Obxectivos	7
3. Material e métodos	9
Organismos de estudo	
Selección de xenes	
Extracción de ARN e preparación de alícuotas	
Deseño e comprobación de <i>primers</i>	
Síntese de ADNc	
PCR cuantitativa en tempo real	
Análise estatística	
4. Resultados	15
5. Discusión	17
6. Conclusións	21
Referencias	23

Introdución

Harmful Algal Blooms

As *Harmful Algal Blooms* (HABs) son acumulacións de organismos microscópicos, principalmente microalgas, nas augas, que producen efectos adversos nos ecosistemas, a saúde pública e a economía, xa sexa debido á súa propia biomasa ou a toxinas endóxenas (Glibert, 2005). Os problemas económicos ocasionados polos HABs poden ser debidos ás perdas en pesca e marisqueo, así como ás relacionadas coa sanidade e o turismo.

As toxinas producidas polos HABs poden causar a morte directamente a peixes e moluscos, ou ben producirlles pouco dano pero acumularse, prexudicando os consumidores na cadea trófica, incluíndo os humanos (Figura 1). Existe un amplo rango de toxinas producidas polos HABs, entre as que podemos destacar as brevetoxinas, causantes do *Neurotoxic Shellfish Poisoning* (NSP); as saxitoxinas, causantes do *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP); ácido domoico, causante do *Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP); azaspirácido, causante do *Azaspiracid Shellfish Poisoning* (AZP); e o ácido okadaico e derivados, obxecto de estudo deste traballo, causantes do *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP) (Glibert, 2005).

A natureza das HABs está determinada en última instancia pola oceanografía das costas. Estas poden ter orixe fóra da costa, de xeito natural, ou ben poden desencadearse por factores antropoxénicos. Os HABs prodúcense en todo o mundo de xeito periódico, resultando máis frecuentes no verán. Ademais, nos últimos anos observouse un aumento na súa frecuencia a nivel mundial (Backer e McGillicuddy, 2006).

De entre todas as toxinas mencionadas, as DSP son as que máis relevancia teñen nas costas de Galicia debido á súa alta frecuencia de aparición. O ácido okadaico e os seus análogos (*dinophysis toxins*: DTX-1, 2 e 3) producen a síndrome gastrointestinal en humanos coñecida como *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP) tras o consumo de organismos mariños contaminados durante as HABs, como poden ser os mexillóns de batea. As toxinas DSP producen a inflamación do tracto intestinal, sendo a diarrea o síntoma principal, que pode aparecer dende 30 minutos a unhas horas despois do consumo. Outros síntomas son as náuseas, a dor abdominal e os vómitos (European Commission Panel, 2008). A recuperación ocorre aos 3 días aproximadamente. Así mesmo, sábese que producen danos na mucosa intestinal, e que po-

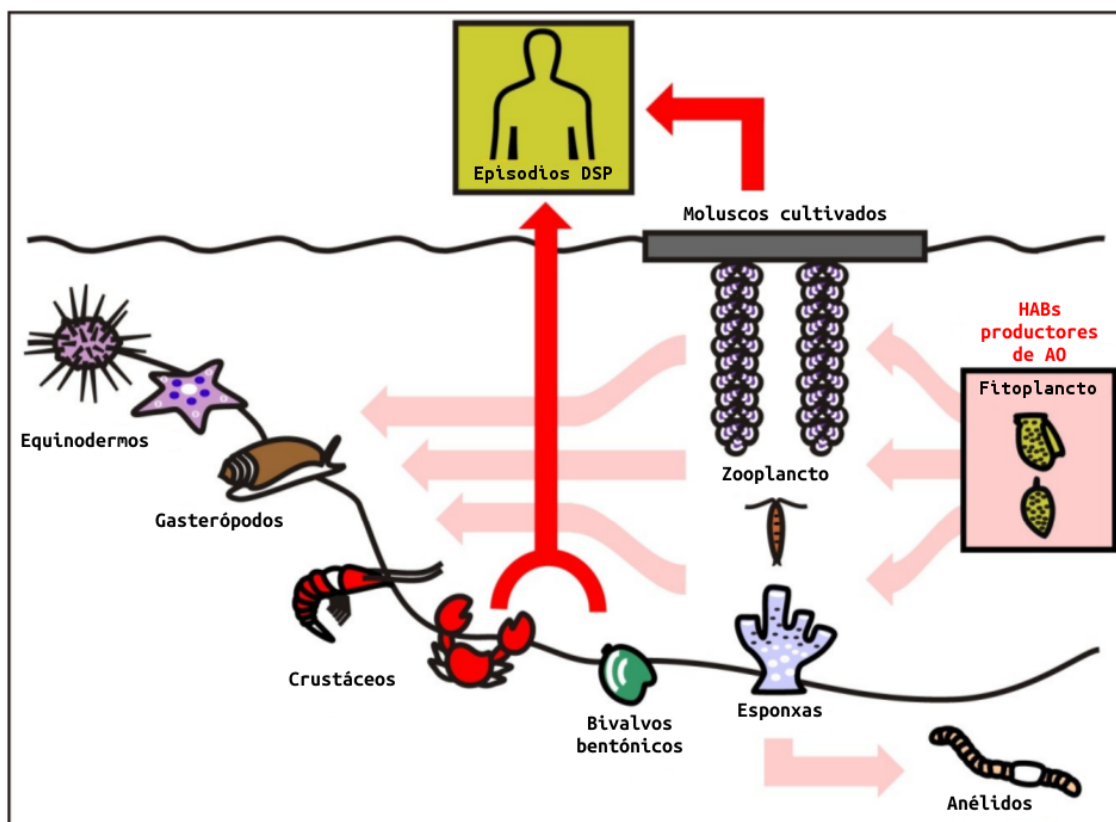


Figura 1: Esquema representativo da transmisión da toxina ácido okadaico a través da cadea trófica. As frechas vermellas indican a transmisión aos consumidores humanos causando o DSP. Modificado de Prego-Faraldo *et al.*, 2013.

derían estar implicadas na formación de tumores (European Commission Panel, 2008) (Fujiki e Suganuma, 1999) (Garthwaite, 2000) (Huang *et al.*, 2010). As toxinas DSP atópanse distribuídas por todo o mundo, sendo especialmente abundantes en Europa, Xapón e Suramérica (Backer e McGillicuddy, 2006).

Ácido Okadaico (AO)

O AO ($C_{44}H_{66}O_{13}$) é unha toxina lipofílica e termoestable (European Commission Panel, 2008) (Figura 2). Describiuse por vez primeira en 1981 nas esponxas do xénero *Halichondria*, pero actualmente sábese que a producen principalmente dinoflaxelados dos xéneros *Prorocentrum* e *Dynophysis*.

A toxicidade do AO débese á súa función como potente inhibidor específico das serín/treonín fosfatasas 1 (PP1) e 2A (PP2A), o cal produce un incremento na fosforilación de numerosas proteínas (Bialojan e Takai, 1988) e a inflamación do intestino, ocasionando perda de fluídos por parte das células intestinais e a consecuenta diarrea (Valdiglesias *et al.*, 2014).

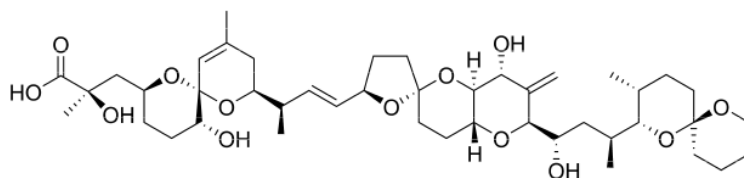


Figura 2: Estrutura química do ácido okadaico (Gerssen *et al.*, 2010).

Porén, Munday (2013) insiste na necesidade de reformular a idea asumida de que a inhibición das fosfatasas é a única causa da toxicidade.

Debido ao seu carácter lipofílico, o ácido okadaico acumúlase nos tecidos graxos dos bivalvos, especialmente na glándula dixestiva. Aínda que o AO é tóxico incluso a baixas concentracións para cultivos celulares de mamíferos, os mexillóns, ao atoparse expostos frecuentemente a este composto (Prego-Faraldo *et al.*, 2013), poden ser capaces de soportalo, modificándoo mediante diversas transformacións (Valdiglesias *et al.*, 2014). Cabe pensar que dispoñen de mecanismos para prever o dano.

A detoxificación tras a ingestión de fitoplancto tóxico prodúcese de xeito natural nos bivalvos, pero a taxa a que isto ocorre pode variar moito entre especies, estación (unha baixa temperatura na auga ralentiza o proceso), sitio de acumulación ou tipo de alimentación. Certos estudos suxiren que este último é un dos principais factores (Blanco *et al.*, 1999).

Monitorización do ácido okadaico

A estabilidade das toxinas DSP implica que nin cociñar os mexillóns nin a depuración son procesos efectivos ou viables para reducir a toxicidade (Valdiglesias *et al.*, 2014). Os mexillóns de batea filtran un maior volume de microalgas tóxicas en comparación cos bivalvos infaunais, xa que nestes últimos o sedimento actúa como un filtro reducindo a exposición. Polo tanto, ante a presenza de HABs deben pechase as bateas ata que se restablezan niveis seguros para evitar a entrada das toxinas na cadea alimentaria humana. Para minimizar as perdas económicas é preciso optimizar os sistemas de detección.

Os métodos de detección baseados en parámetros biolóxicos son os máis utilizados actualmente (Prego-Faraldo *et al.*, 2013). A Comisión de Regulación (EC) No. 2074/2005 especifica o uso do bioensaio do rato (*Mouse Bioassay* ou MBA) ou da rata (*Rat Bioassay* ou RBA) para as toxinas mariñas lipofílicas. No MBA, un extracto do mexillón de 25 g de carne é inxectado aos ratos intraperitonealmente, resultando positivo se 2 de cada 3 ratos morren nun período de 24 horas. O capítulo V (2) (c) e (e) da Sección VII do Anexo II á regulación (EC) No 853/2004 establece un máximo de 160 microgramos de equivalentes de AO por quilogramo do corpo total ou calquera parte comestible do molusco bivalvo (European Commission Panel, 2008).

Porén, os bioensaios empregados na Unión Europea suscitan problemas éticos en canto ao sufrimento por parte do animal durante o procedemento, así como problemas técnicos

(entre moitos outros: alta variabilidade nos resultados, potencial para falsos positivos e falsos negativos, requirimento de instalacións para os animais, etc.) e dúbidas entre a comunidade científica por non reflectir os métodos máis avanzados que existen e que non precisan experimentación animal. Aínda que a Comisión de Regulación (EC) No 2074/2005 recolle o uso de métodos de detección alternativos, non especifica os criterios que deben satisfacerse, polo que é preciso profundar no estudo destes métodos máis precisos para facilitar a súa validación e aproximarnos ao cumprimento da directiva 86/609/EEC, reducindo ao mínimo o número de animais empregados na experimentación ou investigación. Aínda que están dispoñibles métodos cuantitativos químicos e bioquímicos como o LC-MS con potencial nas análises de multi-toxinas, o Joint FAO/IOC/WHO *ad hoc* Expert Consultation sinala que, debido á complexidade e diversidade dalgúns grupos de toxinas, é máis conveniente encamiñar as investigacións aos biomarcadores e os ensaios funcionais (European Commission Panel, 2008).

Un biomarcador é un parámetro que reflicte a interacción entre un sistema biolóxico e un risco potencial físico, químico ou biolóxico. Entre os diferentes tipos que existen, os biomarcadores de efecto constitúen un cambio bioquímico, fisiolóxico ou comportamental nun organismo que está asociado cunha posible mingua da saúde (WHO e IPCS, 1993). Posto que os efectos biolóxicos dos xenobióticos aparecen primeiro a nivel molecular ou bioquímico, a utilización de biomarcadores moleculares considérase un método de detección temperá dos efectos a longo prazo a nivel de individuo, poboación, comunidade ou ecosistema (Cajaraville *et al.*, 2000).

A utilización de biomarcadores moleculares a nivel transcriptómico para a detección do AO permitiría acelerar o proceso actual de regulación do peche das bateas de mexillón, incrementando á súa vez a especificidade do ensaio con respecto ao MBA, o cal implica unha maior seguridade alimentaria e, consecuentemente, unha maior confianza por parte do consumidor.

Transcriptómica en moluscos bivalvos

O estudo das “*omics*” (xenómica, epixenómica, transcriptómica, proteómica e metabolómica) é un campo en expansión en todos os ámbitos da bioloxía. Porén, este aspecto dos moluscos, sendo o grupo de animais mariños máis diverso, clave nos ecosistemas e un importante recurso alimenticio, permanece aínda pobremente explorado (Suárez-Ulloa *et al.*, 2013).

Ata a data, o único xenoma de bivalvo secuenciado por completo rematouse en 2012 e corresponde á ostra *Crassostrea gigas* (Zhang *et al.*, 2012). Esta escaseza de estudos é, posiblemente, consecuencia da complexidade do xenoma dos bivalvos, debido ás súas unidades repetitivas non codificantes e ao seu tamaño. O xenoma de *C. gigas* revelou unha grande expansión de xenes da HSP70 e inhibidores da apoptose, suxerindo unha relación coa adaptación ao ambiente inestable da zona intermareal. Outros estudos transcriptómicos en bivalvos tamén permitiron identificar xenes implicados nas respostas e na adaptación ás condicións externas (Suárez-Ulloa *et al.*, 2013).

MytiBase é a primeira base de datos normalizada do transcriptoma do mexillón *M. galloprovincialis*, recompilando miles de EST (*Expressed Sequence Tags*) anotadas funcionalmente

(Venier *et al.*, 2009). A utilización de xenotecas normalizadas permite o estudo da expresión diferencial de xenes pouco abundantes, avantaxando neste aspecto as xenotecas de hibridación substractiva (*Suppression Subtractive Hybridization* ou SSH) (Zhulidov *et al.*, 2004).

As xenotecas resultan interesantes para unha selección preliminar de xenes expresados diferencialmente en certas condicións, pero é preciso validar os resultados mediante a PCR cuantitativa en tempo real (qPCR), a cal se considera unha técnica moi específica para a cuantificación de diferencias na expresión xénica entre mostras (Taylor *et al.*, 2010). A normalización é un dos aspectos máis importantes e, porén, complicados da qPCR. A variabilidade inherente do ARN, dos métodos de extracción e das eficiencias de amplificación fan necesaria a aplicación de técnicas que controlen este erro. Isto pode conseguirse a varios niveis dentro do proceso experimental (Huggett *et al.*, 2005): a nivel da extracción de ARN, procurando que as mostras teñan un tamaño similar; na síntese de ADNc, utilizando alícuotas con concentracións moi similares; e na qPCR, medindo unha referencia interna mediante os xenes de referencia.

En Galicia, os mexillóns teñen especial relevancia económica na alimentación así como polo seu papel de organismos centinela para a detección da contaminación ambiental. A lenta eliminación dos xenobióticos debida ás baixas taxas de biotransformación posiciona o xénero *Mytilus* como organismo extensamente utilizado a nivel mundial para a medida da contaminación (Livingstone, 1994). A pesar de existir numerosos estudos dos efectos do AO en mamíferos, nos organismos mariños, diana principal deste composto, descoñécese aínda gran parte dos seus efectos. É precisa, por tanto, a realización de estudos transcriptómicos a nivel da primeira liña de entrada do AO, o cal abrirá as portas ao desenvolvemento de biomarcadores de detección temperá, incrementando e eficiencia da xestión das bateas de mexillón.

A natureza sedentaria dos mexillóns, que os condiciona a unha maior exposición aos tóxicos, pon de relevancia os procesos de adaptación, reparación e apoptose. Nestes procesos teñen papeis clave as caspasas, as proteínas de choque térmico, e o citocromo P450.

As caspasas son proteínas mediadoras no proceso apoptótico, que transducen o sinal de morte escindindo numerosas proteínas.

As *Heat Shock Proteins* son chaperonas que permiten o correcto pregamento e ensamblaxe das proteínas e que se atopan moi conservadas na evolución. Realizan funcións de mantemento celular e actúan como inhibidoras da apoptose.

O citocromo P450 ten un importante papel en procesos de detoxificación. É o compoñente terminal do sistema MFO (*mixed-function oxygenase*) que forma parte da fase I da biotransformación, e cataliza a oxidación de diversas substancias inserindo un átomo do osíxeno molecular no substrato (Gibson e Skett, 2001).

O xene *p53* é un xene supresor de tumores fundamental no control do ciclo celular (Mutray *et al.*, 2005). Codifica para un regulador da transcripción, promovendo a expresión de xenes que controlan a reparación e edición do ADN, a apoptose e a carcinoxénese. Normalmente atópase inactivo ou degrádase rapidamente, pero actívase tras o dano no ADN, evitando a formación de tumores malignos.

Outros xenes de interese son os da citocromo c oxidasa (COX), que é a encima encargada

da redución do osíxeno molecular (O_2) a H_2O na cadea respiratoria mitocondrial. A encima está composta por subunidades polipeptídicas codificadas por xenes tanto nucleares como mitocondriais.

Este traballo englobase dentro dos proxectos de investigación levados a cabo polo grupo XENOMAR da Universidade da Coruña. O proxecto de que deriva ten por obxecto a avaliación dos efectos inducidos polo AO a concentracións baixas e tempos de exposición curtos, así como a identificación das principais rutas moleculares e celulares afectadas por esta toxina. Os resultados derivados deste proxecto poderían conducir á identificación de posibles biomarcadores temperás de presenza de AO.

Obxectivos

O presente traballo ten como principal obxectivo o estudo da expresión xénica dos xenes *citocromo oxidasa subunidade II*, *citocromo oxidasa subunidade III*, *caspasa 3 7-3*, *p53*, *citocromo P450* e *heat shock protein 70* en branquia do mexillón *Mytilus galloprovincialis* tras a súa exposición a un cultivo de *Prorocentrum lima* durante un día, coa finalidade de buscar posibles biomarcadores de detección temperá de presenza de AO no medio mariño. Este obxectivo xeral pode subdividirse en:

- Estudo da expresión dos xenes en branquia de mexillóns tratados cunha concentración baixa (200 células/mL) de células de *Prorocentrum lima*.
- Estudo da expresión dos xenes en branquia de mexillóns tratados cunha concentración alta (20000 células/mL) de células de *Prorocentrum lima*.

Material e métodos

Organismos de estudo

Os organismos de estudo foron mexillóns *Mytilus galloprovincialis* adultos de ambos os sexos recolectados dunha zona de rocha da praia de Valcovo. Tras 72 horas de aclimatación nunha cámara de fotoperíodo, os mexillóns foron divididos en 3 grupos: a) Control: alimentados coas microalgas *Isochrysis galbana* e *Tetraselmis suecica* durante 1 día, b) Tratados coa microalga tóxica *Prorocentrum lima* a unha concentración de 200 células/mL durante 1 día, e c) Tratados con *Prorocentrum lima* a unha concentración de 20000 células/mL durante 1 día. Os grupos b) e c) foron tamén alimentados coas mesmas microalgas que os controis. As concentracións de células produtoras de AO escolléronse co fin de determinar se a expresión diferencial dos xenes é dependente da dose, xa que se sabe que o tempo de exposición é un factor importante nalgúns casos (Valdiglesias *et al.*, 2012).

Seleccionouse o tecido de branquia polo seu papel na filtración da materia suspendida e como barreira de defensa.

Selección de xenes

A selección baseouse en dous criterios. Os xenes da citocromo oxidasa subunidades II (COXII) e III (COXIII) escolléronse a partir de xenotecas normalizadas de branquia do mexillón *Mytilus galloprovincialis*, en que mostraron expresión diferencial en función do tratamento con AO (para COXII atopáronse 370 lecturas na xenoteca control e 90 na tratada, e para COXIII atopáronse 91 lecturas na xenoteca control e 75 na tratada). O resto de xenes seleccionáronse debido ao seu interese por formar parte de rutas relacionadas coa apoptose (*caspasa 3 7-3*, *heat shock protein 70*), a detoxificación (*citocromo P450*) ou o cancro (*p53*). Todos os xenes foron anotados previamente no laboratorio utilizando o programa Blast2GO a través do CESGA (Centro de Supercomputación de Galicia).

Utilizáronse dous xenes referencia (*housekeeping*) para corrixir as diferenzas entre a cantidade de ADNc usado como molde mediante a normalización. Escolléronse os xenes *rps4*

(*ribosomal protein S4*) e *gadh* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), recomendados por Martínez-Escauriaza Arias (2013), cuxa expresión estable foi comprobada previamente no laboratorio mediante os algoritmos geNorm e Normfinder.

Extracción de ARN e preparación de alicuotas

O ARN foi extraído da branquia dun total de 3 *pools* de individuos, correspondentes aos 3 grupos indicados na sección anterior. A partir de cada un dos grupos realizáronse 5 extraccións distintas (réplicas biolóxicas).

Utilizouse o reactivo Trizol (Trizol Reagent, Life Technologies), seguindo as recomendacións do produto, para illar o ARN total. Engadiuse 1 mL de Trizol por cada 100 mg de tecido, triturouse co homoxenizador Micra D1 (Art Moderne Labortenchnich) en xeo. Centrifugouse 1 mL de cada mostra durante 10 minutos a 12000 g, ao sobrenadante engadiuse 0,2 mL de cloroformo e, tras un vórtex, centrifugouse durante 15 minutos a 12000 g. Retírouse posteriormente a fase acuosa, onde se atopa o ARN, a que se engadiu 500 μ L de isopropanol frío. Tras 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugouse 10 minutos a 12000 g, descartouse o sobrenadante e engadiuse 1 mL de etanol 75 % ao pellet. Tras un vórtex, centrifugouse 5 minutos a 7500 g, descartouse o sobrenadante e resuspendeuse o pellet con 75 μ L de auga milli-Q. As mostras incubáronse a 50°C ata que se dissolveu o pellet. O RNA extraído foi disolto en auga milliQ autoclavada.

Comprobouse a calidade do ARN extraído co Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). As mostras que non pasaron os criterios establecidos purificáronse máis engadindo 1/10 en volume de acetato sódico 3M pH 5 e 2,5 de volume de etanol 100 % frío e deixáronse precipitar a -20°C. Ao día seguinte centrifugáronse a 1200 g durante 5 minutos e realizáronse 2 lavados con etanol como se describiron anteriormente. Todos os pasos da extracción do ARN realizáronse en frío a 4°C e o material de traballo foi tratado con RNase free (RNase Free 1 Liter Surface Decontaminant).

Posteriormente, preparáronse alicuotas de 100 ng/ μ L (como xa se mencionou, procurouse a máxima similitude entre mostras para a normalización) que foron utilizadas nos seguintes pasos.

Deseño e comprobación de *primers*

Os *primers* para levar a cabo a qPCR foron deseñados a partir das secuencias EST (*Expressed Sequence Tags*) usando a ferramenta Universal Probe Library (Roche), seguindo os parámetros por defecto. Os *primers* deseñados para cada xene e o tamaño do amplicón resultante aparecen indicados na Táboa 1.

O correcto funcionamento dos *primers* foi comprobado para asegurar a eficacia da qPCR. Inicialmente sintetizouse ADNc a partir de 2 alicuotas control e 2 tratadas (200 cél/mL) co kit comercial RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), seguindo as instrucións do fabricante.

Xene	Primer forward	Primer reverse	Amplicón
<i>gadph</i> *	aggaatggccttcagggtac	tcagatgctgctttaatggctg	114 nt
<i>rps4</i> *	tgggttatcgagggcgtag	tcccttagtttgtaggacctg	138 nt
<i>COXII</i>	tcgatattttggtgatattgtcca	tcatacacaatccatgataccg	71 nt
<i>COXIII</i>	aaggtcaggcttagaagagtgatt	gccccctgccaagtttac	60 nt
<i>caspasa 3 7-3</i>	tctgttgaacctatttaccagtctc	tgctgttcggaactcctctt	95 nt
<i>p53</i>	tgctccttagcaaccaggac	ggctgctcgacaacaacat	60 nt
<i>CYP450</i>	ttagtgatatacaagacggttcaa	gttgtatcagtattcatcatctggaaa	61 nt
<i>HSP70</i>	actgggttcatggccactt	gccttcacagacaccgaaag	65 nt

Táboa 1: Secuencias dos *primers* correspondentes a cada xene e tamaño do amplicón resultante expresado en nucleótidos. *: xenes utilizados como *housekeeping*. *COXII*: citocromo *c* oxidasa subunidade II; *COXIII*: citocromo *c* oxidasa subunidade III

As secuencias específicas para cada xene amplificáronse cos *primers* correspondentes co kit comercial Supreme NZY Taq DNA polymerase (NZYTech). A amplificación realizouse cun paso inicial de 2 minutos a 94°, seguido de 35 ciclos de 20 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de anelamento a 55°C e 30 segundos de extensión dos *primers* a 72°C, e cun paso final de 7 minutos a 72°C.

Finalmente, mediante electroforese comprobouse que o tamaño dos amplicóns resultantes se corresponde co esperado e que non existe contaminación, dimerización ou amplificación aleatoria; é dicir, que se cumpre a especificidade do *primer* (Figura 3).

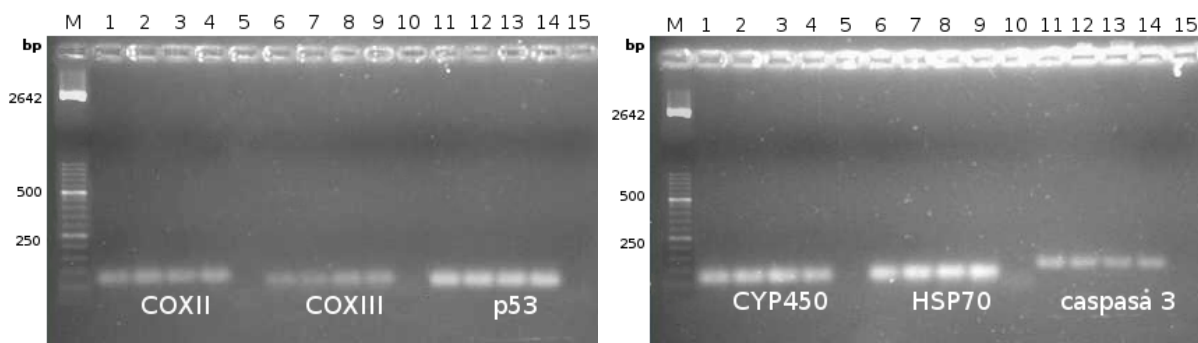


Figura 3: Xel de agarosa ao 2,5% onde aparecen os produtos de amplificación dos *primers*. Utilizouse o marker XIII (M) que separa de 50 en 50 pb. Os xenes de referencia non foron incluídos posto que o seu funcionamento xa se comprobou con anterioridade. Os pocillos 1, 2, 6, 7, 11 e 12 cargáronse as mostras control e nas 3, 4, 8, 9, 13 e 14 cargáronse as mostras tratadas. Os pocillos 5, 10 e 15 correspóndense cos brancos (ningún ADNc).

A eficacia dos *primers* dos xenes de referencia *rps4* e *gadph* utilizados para a normalización foi comprobada con anterioridade no laboratorio.

Síntese de ADNc

A partir das alícuotas preparadas de ARN, sintetizouse ADNc co kit comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Seguíronse as instrucións indicadas polo fabricante, utilizando 10 μ L das alícuotas de ARN para empregar 1 μ g como se especifica.

Este ADNc utilizouse no seguinte paso de estudo cuantitativo da expresión diferencial mediante qPCR.

PCR cuantitativa en tempo real

A PCR cuantitativa en tempo real ou qPCR realizouse co kit comercial FastStart Essential DNA Green Master (Roche), no instrumento Light Cycler 96 (Roche). O programa empregado esquematízase na Figura 4.

Cada pocillo duplicouse obtendo unha réplica técnica de cada mostra, e incluíronse controis negativos (sen ADNc) para cada xene a analizar.

Programa	Ciclos	Parámetros
Preincubación	1	95°C , 600 s
Amplificación en 3 pasos	45	95°C , 10s 60°C , 10s 72°C , 10s
Melting	1	95°C , 5s 65°C , 60s 97°C , 1s
Enfriamento	1	40°C , 20s

Figura 4: Pasos utilizados para realizar a qPCR. O programa determina a función dentro do proceso, acompañado do número de ciclos e os parámetros de temperatura e tempo correspondentes.

Os resultados foron recollidos e procesados co LightCycler Software 1.5.0 (Roche).

Análise estatística

Os datos foron analizados co programa REST 2009 V2.0.13. Asumiuse unha eficiencia da qPCR dun 100 %. As réplicas técnicas foron avaliadas mediante a función *badCt* do paquete EasyqpcR de R (Pape, 2012). A máxima diferenza de Cq entre réplicas técnicas estableceuse como 0,5 e non se tiveron en conta as réplicas cun Cq maior de 35.

A hipótese alternativa (H1) utilizada por REST 2009 considera que as diferenzas que poidan existir entre o grupo tratado e o control se deben unicamente ao azar. Para que esta hipótese sexa certa, as diferenzas resultantes tras intercambiar mostras aleatoriamente entre os dous grupos non serán maiores que nos grupos iniciais. Para comprobar isto, REST

realiza técnicas de aleatorización (10000 intercambios aleatorios) e contabiliza as veces que a expresión relativa dos datos aleatorios é maior que a dos orixinais (Pfaffl, 2009). As diferenzas considéranse significativas cando o p valor: $P(H1) < 0,05$.

Resultados

Tras o segundo paso de purificación, todas as mostras de ARN empregadas deron un ratio de OD260/280 entre 1.8–2.0, o cal é indicador da súa boa calidade (Taylor *et al.*, 2010).

A Táboa 2 mostra os resultados da análise estatística con REST. A unha concentración de 200 células/mL, os xenes da caspasa 3 e do CYP450 mostran unha expresión diferencial significativa (sobreexpresión) con respecto aos controis (p-valores de 0,006 e 0,010, respectivamente). Cando a concentración aumenta a 20000 células/mL tan só o *CYP450* mantén a expresión diferencial cun p-valor de 0,032.

Xene	p-valor	
	200 cél/mL	20000 cél/mL
COX II	0,158	0,806
COX III	0,073	0,468
Caspasa 3	0,006	0,356
p53	0,137	0,280
CYP450	0,012	0,028
HSP70	0,091	0,785

Táboa 2: P-valores obtidos para cada xene a concentracións de 200 e 20000 células/mL. As diferenzas consideráronse significativas cun p-valor < 0,05 (valor en negra).

Na Figura 5 aparece representada a expresión relativa dos xenes obxecto de estudo para cada tratamento (200 e 20000 cél/mL), calculada como o logaritmo en base 10 da relación entre a expresión das mostras tratadas e as controis.

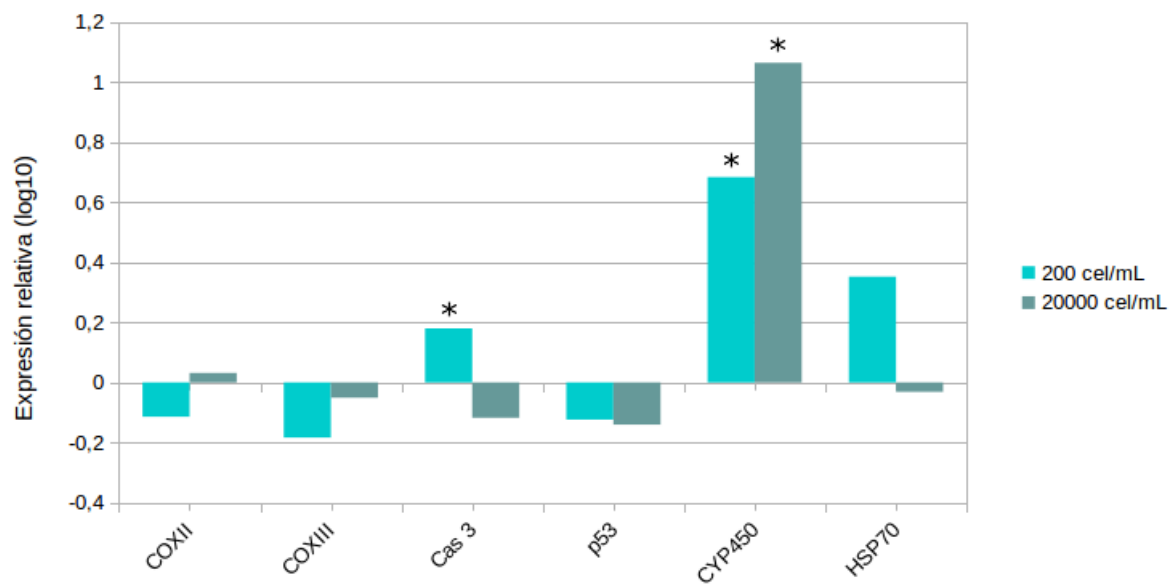


Figura 5: Expresión relativa das mostras tratadas (concentracións de 200 e 20000 cél/mL) con respecto aos controis (concentración de 0 cél/mL) para cada xene analizado. *: expresión diferencial significativa (p-valor < 0,05).

Discusión

Os resultados obtidos neste traballo contribúen ao avance no coñecemento do transcrito dun organismo de especial relevancia para Galicia como é o mexillón *Mytilus galloprovincialis*. Ante a escaseza de estudos transcriptómicos tanto no mexillón como nos moluscos bivalvos en xeral, os nosos resultados tan só permiten realizar unha discusión preliminar, poñendo de relevancia o interese deste traballo. Os experimentos levados a cabo mostran por primeira vez a expresión diferencial do xene da caspasa 3 ante a exposición a AO, e confirman as observacións previas obtidas con respecto ao CYP450.

Os nosos experimentos non mostraron variacións significativas na expresión da *COXII* e *COXIII* ante a exposición a AO, a diferenza do que se atopara previamente nas xenotecas normalizadas. Isto mostra a importancia da validación da expresión diferencial dos xenes mediante a qPCR.

Segundo demostraron Lee, Bender e Kadenbach (2002) en fígado bovino, a actividade de COX está relacionada coa formación de ROS (*Reactive Oxygen Species*). Así mesmo, Túnez *et al.* (2003) concluíron que o AO produce estrés oxidativo no cerebro de ratas, o cal Valdiglesias *et al.* (2012) relacionaron coa represión na expresión de *COXII* en humanos tras 24 h de exposición a AO. Neste estudo establecemos o paralelismo cos efectos do AO na expresión de *COXII* de mexillón tras 24 h de exposición, sen atopar expresión diferencial. Nos mexillóns, expostos de forma natural ao AO, este parece non producir o estrés oxidativo observado en ratas.

Por outra banda, *COX III* atopouse sobreexpresada en branquia de *M. galloprovincialis* e *M. trossulus* como resposta a un choque hipoosmótico durante 4 horas (Lockwood e Somero, 2011).

A redución nos niveis de expresión dalgunha das subunidades da COX dificultaría a biosíntese e ensamblaxe da holoenzima, o cal implicaría a inhibición da súa actividade, un mal funcionamento da mitocondria, e finalmente, o esgotamento das fontes de enerxía (Papadopoulou *et al.*, 1999).

A proteína p53 pertence a unha familia homónima ben caracterizada e que xa se sinalou

como posible biomarcador de estrés xenotóxico en mexillóns, atopándose actualmente baixo investigación (Muttray *et al.*, 2005) (Banni *et al.*, 2009).

Aínda que os nosos resultados non detectan represión de *p53* nas mostras tratadas con respecto aos controis, Zhang *et al.* (1994) demostraron en células humanas que o tratamento con AO, a través da inactivación das serín/treonín fosfatasas, produce a hiperfosforilación de p53, diminuindo a súa actividade promotora da transcripción de xenos. Posto que p53 controla xenos relacionados co ciclo celular, isto suxire un posible mecanismo de formación de tumores mantendo os niveis de expresión do xene *p53* constantes.

A proteína HSP70 actúa como inhibidora da apoptose participando na ruta dependente das caspasas, *downstream* da liberación do citocromo c dende a mitocondria ao citosol, e *upstream* da activación da caspasa 3 por escisión, como demostraron Li *et al.* (2000) *in vitro*. HSP70 impide a escisión da caspasa 3, mediante o seu dominio *peptide-binding*, así como a fragmentación do ADN. Porén, Jäättelä *et al.* (1998), estudaron a inhibición da apoptose por parte da HSP70 sen efectos na activación da caspasa 3, actuando *downstream* dela. Chang, Huang e Liu (1993) suxiren que a inhibición das fosfatasas producida polo AO permite a fosforilación de compoñentes do complexo transcripcional dos xenos *heat shock* (pero non os basais), potenciando a actividade do promotor de *HSP70*.

Baixo condicións de estrés, aumenta a dependencia celular nas chaperonas. As proteínas mutadas (como a p53) requiren máis atención das chaperonas HSP70 que as proteínas normais, permitindo o mantemento da función como consecuencia da interacción, ou alternativamente, producindo a marcaxe desas proteínas para a degradación e evitando a acumulación de proteínas deletéreas (Mayer e Bukau, 2005).

A HSP70 12 atopouse reprimida en branquia de *M. galloprovincialis* e *M. trossulus* como resposta a un choque hipoosmótico durante 4 horas (Lockwood e Somero, 2011).

As proteínas de estrés-70 xa foron propostas como biomarcadores de contaminación (Porte *et al.*, 2001). O aumento dos niveis de HSP70 incrementa a resistencia contra axentes inductores da apoptose, mentres que a represión da HSP70 aumenta a sensibilidade cara a estes axentes (Mayer e Bukau, 2005).

Os resultados deste traballo contrastan cos obtidos previamente no laboratorio, que mostraban a sobreexpresión do xene *HSP70* ante a exposición a AO a 200 cél/mL durante 1 día. Por tanto, sería preciso repetir o experimento para poder discutir os resultados.

O sistema monoosixenasa do CYP450 participa no metabolismo dos xenobióticos, polo que é amplamente utilizado como biomarcador específico para contaminantes orgánicos como os PAHs (Bebiano *et al.*, 2007), especialmente en peixes (Cajaraville *et al.*, 2000).

Os nosos resultados mostrando a sobreexpresión do xene *CYP450* en branquia de mexillón tanto a 200 como a 20000 células/mL coinciden cos obtidos en hepatopáncreas por Flórez Barrós (2012), pero non cos obtidos en branquia. Por tanto, a pesares de considerar a branquia como un tecido menos activo en procesos de detoxificación, non se pode ignorar o seu papel como primeira barreira fronte á exposición a AO.

Por tanto, como foi descrito en células humanas (Guo, An e Rein, 2010), parece existir unha implicación do CYP450 no metabolismo do AO, aínda que é posible que os metabo-

litos resultantes non produzan unha redución significativa da súa toxicidade debido a que o seu papel inhibitor das fosfatasas só diminúe lixeiramente. A constancia observada na sobreexpresión de *CYP450* nos nosos experimentos posicionan este xene como un posible biomarcador tamén para a detección do AO.

O aumento dos niveis de CYP450 tras a exposición a AO deixa lugar a unha posible sobreexpresión de *GST* (*Glutathion S Transferasa*) que se conxugue cos seus metabolitos, pois é unha encima de fase II. Sería interesante proseguir coa avaliación da expresión diferencial de GST.

Curiosamente, os resultados derivados da exposición a AO contrastan coa resposta ao estrés salino, o cal parece reprimir a expresión de *CYP450* en branquia de *M. galloprovincialis* e *M. trossulus* tras un tratamento de choque hipoosmótico de 4 horas (Lockwood e Somero, 2011).

O mecanismo regulador do proceso apoptótico parece ser a represión ou sobreexpresión de xenes das caspasas (Romero *et al.*, 2011).

Ante a presenza dun xenotóxico, prodúcese a liberación do citocromo c ao citosol o cal, xunto con dATP, activa a expresión dos xenes *caspasa 9* e *caspasa 3*, iniciando a cascada de proteasas apoptóticas (Li *et al.*, 1997). A caspasa 3 activa mediante escisión a proteína heterodimérica DFF (*DNA Fragmentation Factor*), a cal leva á fragmentación do ADN (Jänicke *et al.*, 1998) característica da apoptose.

Os nosos resultados en branquia tras 1 día de tratamento con AO concordan cos realizados por Romero *et al.* (2011) en hemocitos da mesma especie tras 24 horas de exposición a luz UV, en que a caspasa 3 7-3 apareceu sempre sobreexpresada. É sabido que a luz UV activa as rutas das kinasas do estrés (JNK, MAPK), induce dano mitocondrial e no ADN, e leva por tanto á apoptose mediada por caspasas.

Estes resultados indican a relación entre o AO e a apoptose. É preciso explicar, porén, por que a sobreexpresión non ocorre a altas concentracións (20000 cél/mL). É posible que ante estas concentracións de AO, as células sexan incapaces de activar as rutas apoptóticas e se produza a necrose.

Deste xeito, tanto a sobreexpresión como o mantemento na expresión dos xenes estudados achega coñecementos á comprensión da fisioloxía e aos mecanismos adaptativos de *M. galloprovincialis*. O CYP450 parece confirmarse como posible biomarcador de detección temperá, e establecemos un punto de partida para futuros estudos sobre a utilización da caspasa 3 7-3 para este mesmo fin. Porén, é preciso ter en conta que o tratamento se levou a cabo en condicións de laboratorio, e por tanto sería conveniente a confirmación destes resultados mediante a utilización de mexillóns de batea durante o desenvolvemento dunha HAB. En experimentos futuros, sería tamén importante o estudo da expresión destes xenes en individuos xuvenís, os cales poden presentar unha maior sensibilidade, así como a separación dos individuos por sexos. A expresión diferencial entre tecidos é outro aspecto relevante á hora de realizar a análise dos biomarcadores. Por exemplo, Romero *et al.* (2011) atoparon que os niveis de expresión da caspasa 3 7-3 en branquia son intermedios entre os musculares (mínimos) e os glandulares (máximos).

Conclusións

As conclusións do presente traballo son as seguintes:

- Os xenes da *citocromo oxidasa subunidade II*, *citocromo oxidasa subunidade III*, *p53* e *heat shock protein 70* non mostraron variacións significativas na expresión con respecto aos controis.
- A unha concentración de 200 células/mL de *P. lima* os xenes *caspasa 3 7-3* e *citocromo P450* mostráronse sobreexpresados de xeito significativo con respecto ás mostras control.
- A unha concentración de 20000 células/mL de *P. lima* tan só o xene *citocromo P450* se mostrou sobreexpresado de xeito significativo con respecto ás mostras control.
- O xene do *citocromo P450* parece confirmarse como un posible biomarcador de detección temperá (1 día) da exposición a AO en branquia de *M. galloprovincialis*. O xene da *caspasa 3 7-3* non parece axeitado para este fin por non mostrar diferenzas significativas na súa expresión a concentracións altas de AO.

Referencias

- BACKER, L. e MCGILLICUDDY, D. (2006). Harmful algal blooms. *Oceanography* 19.2, p. 94.
- BANNI, M., NEGRI, A., REBELO, M., RAPALLO, F., BOUSSETTA, H., VIARENGO, A. e DONDERO, F. (2009). Expression analysis of the molluscan p53 protein family mRNA in mussels (*Mytilus* spp.) exposed to organic contaminants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149.3, pp. 414–418.
- BEBIANNI, M. J., LOPES, B., GUERRA, L., HOARAU, P. e FERREIRA, A. M. (2007). Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: Effect of abiotic factors. *Environment International* 33.4, pp. 550–558.
- BIALOJAN, C. e TAKAI, A. (1988). Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J* 256, pp. 283–290.
- BLANCO, J., FERNÁNDEZ, M. L., MIGUEZ, A. e MORONO, A. (1999). Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one-and two-compartment models and the effect of environmental conditions. *Marine Ecology Progress Series* 176, pp. 153–163.
- CAJARAVILLE, M. P., BEBIANNI, M. J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, C. e VIARENGO, A. (2000). The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Science of the Total Environment* 247.2, pp. 295–311.
- CHANG, N.-T., HUANG, L. E. e LIU, A. (1993). Okadaic acid markedly potentiates the heat-induced hsp 70 promoter activity. *Journal of Biological Chemistry* 268.2, pp. 1436–1439.
- EUROPEAN COMMISSION PANEL (2008). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – okadaic acid and analogues. *The EFSA Journal* 589, pp. 1–62.
- FLÓREZ BARRÓS, F. (2012). Desarrollo de biomarcadores citogenéticos y moleculares para su evaluación en moluscos bivalvos. Tese dout. Universidade da Coruña.
- FUJIKI, H. e SUGANUMA, M. (1999). Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 125.3-4, pp. 150–155.

- GARTHWAITE, I. (2000). Keeping shellfish safe to eat: a brief review of shellfish toxins, and methods for their detection. *Trends in Food Science & Technology* 11.7, pp. 235–244.
- GERSSSEN, A., POL-HOFSTAD, I. E., POELMAN, M., MULDER, P. P., VAN DEN TOP, H. e DE BOER, J. (2010). Marine toxins: Chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation. *Toxins* 2.4, pp. 878–904.
- GIBSON, G. G. e SKETT, P. (2001). *Introduction to drug metabolism*. Nelson Thornes.
- GLIBERT, P. M. (2005). The global, complex phenomena of harmful algal blooms. *Oceanography* 18.2.
- GUO, F., AN, T. e REIN, K. S. (2010). The algal hepatotoxin okadaic acid is a substrate for human cytochromes CYP3A4 and CYP3A5. *Toxicon* 55.2, pp. 325–332.
- HUANG, W.-B., REN, H.-L., GOPALAKRISHNAN, S., XU, D.-D., QIAO, K. e 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 Immunology* 28.4, pp. 587–595.
- HUGGETT, J., DHEDA, K., BUSTIN, S e ZUMLA, A (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity* 6.4, pp. 279–284.
- JÄÄTTELÄ, M., WISSING, D., KOKHOLM, K., KALLUNKI, T. e EGEHLAD, M. (1998). Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *The EMBO Journal* 17.21, pp. 6124–6134.
- JÄNICKE, R. U., SPRENGART, M. L., WATI, M. R. e PORTER, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 273.16, pp. 9357–9360.
- LEE, I., BENDER, E. e KADENBACH, B. (2002). Control of mitochondrial membrane potential and ROS formation by reversible phosphorylation of cytochrome c oxidase. *Oxygen/Nitrogen Radicals: Cell Injury and Disease*. Springer, pp. 63–70.
- LI, C.-Y., LEE, J.-S., KO, Y.-G., KIM, J.-I. e SEO, J.-S. (2000). Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *Journal of Biological Chemistry* 275.33, pp. 25665–25671.
- LI, P., NIJHAWAN, D., BUDIARDJO, I., SRINIVASULA, S. M., AHMAD, M., ALNEMRI, E. S. e WANG, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91.4, pp. 479–489.
- LIVINGSTONE, D. (1994). Recent developments in marine invertebrate organic xenobiotic metabolism. *Toxicology and Ecotoxicology News* 1.3, pp. 88–95.
- LOCKWOOD, B. L. e SOMERO, G. N. (2011). Transcriptomic responses to salinity stress in invasive and native blue mussels (genus *Mytilus*). *Molecular Ecology* 20.3, pp. 517–529.
- MARTÍNEZ-ESCAURIAZA ARIAS, R. (2013). Identificación de genes implicados en la eliminación de biotoxinas en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: clonación y expresión de los cDNA que codifican para dos proteínas transportadoras ABC de la subfamilia B (proteínas MDR). Tese dout. Universidade de Santiago de Compostela.
- MAYER, M. e BUKAU, B (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62.6, pp. 670–684.
- MUNDAY, R. (2013). Is protein phosphatase inhibition responsible for the toxic effects of okadaic acid in animals?: *Toxins* 5.2, pp. 267–285.

- MUTTRAY, A. F., COX, R. L., ST-JEAN, S., POPPELEN, P. VAN, REINISCH, C. L. e BALDWIN, S. A. (2005). Identification and phylogenetic comparison of *p53* in two distinct mussel species (*Mytilus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 140.2, pp. 237–250.
- PAPADOPOULOU, L. C., THEOPHILIDIS, G., THOMOPOULOS, G. N. e TSIFTSOGLU, A. S. (1999). Structural and functional impairment of mitochondria in adriamycin-induced cardiomyopathy in mice: suppression of cytochrome *c* oxidase II gene expression. *Biochemical Pharmacology* 57.5, pp. 481–489.
- PAPE, S. L. (2012). *EasyqpcR : EasyqpcR for easy analysis of real-time PCR data at IRTOMIT-INSERM U1082*. English. R package. IRTOMIT-INSERM U1082. sylvain.le.pape@univ-poitiers.fr. URL: <http://irtomit.labo.univ-poitiers.fr/>.
- PFÄFFL, M. (2009). Rest 2009 Software user guide. *Qiagen, Hilden, Germany*.
- PORTE, C., BIOSCA, X., SOLÉ, M e ALBAIGÉS, J (2001). The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussels to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). *Environmental Pollution* 112.2, pp. 261–268.
- PREGO-FARALDO, M. V., VALDIGLESIAS, V., MÉNDEZ, J. e EIRÍN-LÓPEZ, J. M. (2013). Okadaic Acid Meet and Greet: An Insight into Detection Methods, Response Strategies and Genotoxic Effects in Marine Invertebrates. *Marine Drugs* 11.8, pp. 2829–2845.
- ROMERO, A., ESTEVEZ-CALVAR, N., DIOS, S., FIGUERAS, A. e NOVOA, B. (2011). New insights into the apoptotic process in mollusks: characterization of caspase genes in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One* 6.2, e17003.
- SUÁREZ-ULLOA, V., FERNÁNDEZ-TAJES, J., MANFRIN, C., GERDOL, M., VENIER, P. e EIRÍN-LÓPEZ, J. M. (2013). Bivalve Omics: State of the Art and Potential Applications for the Biomonitoring of Harmful Marine Compounds. *Marine drugs* 11.11, pp. 4370–4389.
- TAYLOR, S., WAKEM, M., DIJKMAN, G., ALSARRAJ, M. e NGUYEN, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50.4, S1–S5.
- TÚNEZ, I., MUÑOZ, M., FEIJÓO, M., MUÑOZ-CASTAÑEDA, J. R., BUJALANCE, I., VALDELVIRA, M. E. e LÓPEZ, P. M. (2003). Protective melatonin effect on oxidative stress induced by okadaic acid into rat brain. *Journal of Pineal Research* 34.4, pp. 265–268.
- VALDIGLESIAS, V., FERNÁNDEZ-TAJES, J., PÁSARO, E., MÉNDEZ, J. e LAFFON, B. (2012). Identification of differentially expressed genes in SHSY5Y cells exposed to okadaic acid by suppression subtractive hybridization. *BMC genomics* 13.1, p. 46.
- VALDIGLESIAS, V., LAFFON, B., FERNÁNDEZ-TAJES, J. e MÉNDEZ, J. (2014). Okadaic Acid. *Encyclopedia of Toxicology*. Academic Press, pp. 682–686.
- VENIER, P., DE PITTÀ, C., BERNANTE, F., VAROTTO, L., DE NARDI, B., BOVO, G., ROCH, P., NOVOA, B., FIGUERAS, A., PALLAVICINI, A., *et al.* (2009). MytiBase: a knowledgebase of mussel (*M. galloprovincialis*) transcribed sequences. *BMC genomics* 10.1, p. 72.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION e INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (1993). *Biomarkers and risk assessment : concepts and principles / published under the joint sponsorship of the United Nations environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization*. World Health Organization.

- ZHANG, G., FANG, X., GUO, X., LI, L., LUO, R., XU, F., YANG, P., ZHANG, L., WANG, X., QI, H., *et al.* (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* 490.7418, pp. 49–54.
- ZHANG, W., McCLAIN, C., GAU, J.-p., GUO, X.-Y. D. e DEISSEROTH, A. B. (1994). Hyperphosphorylation of p53 induced by okadaic acid attenuates its transcriptional activation function. *Cancer Research* 54.16, pp. 4448–4453.
- ZHULIDOV, P. A., BOGDANOVA, E. A., SHCHEGLOV, A. S., VAGNER, L. L., KHASPEKOV, G. L., KOZHEMYAKO, V. B., MATZ, M. V., MELESHKEVITCH, E., MOROZ, L. L., LUKYANOV, S. A., *et al.* (2004). Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease. *Nucleic Acids Research* 32.3, e37–e37.

Agradecementos

Este traballo foi posible grazas ao proxecto “Evaluación citogenética y molecular de la respuesta temprana del mejillón *Mytilus galloprovincialis* al ácido okadaico (AO)” AGL2012-30897, concedido polo Ministerio de Economía y Competitividad.

Quero agradecer á miña titora Josefina Méndez Felpeto terme dado a oportunidade de traballar en XENOMAR, así como o apoio e orientación recibidos durante o desenvolvemento deste traballo.

A M^a Verónica Prego Faraldo quero darlle as grazas pola súa xenerosidade ao compartir os seus coñecementos e pola paciencia e tempo adicados a ensinarme a traballar no laboratorio.

Sabela Rodríguez Lorenzo
Xuño de 2014