

Herramientas biotecnológicas en el cultivo de bivalvos

Pedro I. Bustamante

Instituto de Acuicultura, Universidad Austral de Chile

Puerto Montt, Chile

E-mail: pedrobustamante@uach.cl

Bustamante, P.I. 2008. Herramientas biotecnológicas en el cultivo de bivalvos. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12. Roma, FAO. pp. 317–326.

RESUMEN

Las herramientas genómicas, transcriptómicas y proteómicas están cambiando nuestra forma de trabajo y han abierto una gran gama de oportunidades en todos los campos de la investigación. Estas novedosas tecnologías están produciendo un impacto inmediato en las actividades de la acuicultura, principalmente en los países industrializados. En este estudio, exploramos el potencial y las promesas ofrecidas por estas herramientas biotecnológicas para estudiar organismos bivalvos. Investigaciones basadas en mapas genómicos, transcriptomas y proteómicas están siendo llevados a cabo, para estudiar las bases de la expresión genética, de características de interés en la industria de bivalvos, principalmente en la susceptibilidad a enfermedades, tolerancia al stress y crecimiento. La ostra del Pacífico (*Crassostrea gigas*), es el foco de un consorcio internacional para secuenciar su genoma, junto con la secuenciación del genoma mitocondrial de otras especies de bivalvos. La utilización de bivalvos en programas de monitoreo, ha favorecido los estudios proteómicos de las respuestas de estos organismos a agentes xenobióticos y contaminantes. Desafortunadamente, estas tecnologías no están siendo implementadas con la suficiente rapidez, por los países latinoamericanos, considerando, la importancia de las actividades de la acuicultura y la pesca en esta región.

ABSTRACT

Genomic, transcriptomic and proteomic tools are changing the way we work and have opened up opportunities in all fields of research. These new technologies are already having an impact on aquaculture activities, mainly in industrial countries. In this review we explore the potential and promise offered by these biotechnological tools to study bivalve organisms. Research based on genome maps, transcriptomics and proteomics is being carried out to study the genetic expression and molecular bases of traits of interest in bivalve farming industry, mainly disease susceptibility, tolerance to environmental stress and growth. The Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) is the focus of an international genome-sequencing consortium together with mitochondrial genome-sequencing of other bivalve species. The use of bivalves in pollution monitoring programmes has prompted the proteomic studies of the cell and organism responses to xenobiotics and pollutant agents. Unfortunately, these new technologies are not being implemented as

fast as they should by Latin American countries given the importance of the aquaculture and fisheries activities in the region.

INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, los bivalvos siempre se han cultivado; los juveniles en el cultivo de bivalvos, se obtienen y recolectan de zonas naturales de reproducción, para después plantarlos en zonas seleccionadas para facilitar un buen crecimiento y recolectarlos una vez que alcanzan la talla comercial. Utilizando esta estrategia de producción, no ha sido necesario implementar programas de selección genética en bivalvos, a diferencia de la agricultura, donde en los últimos decenios, programas de mejoramiento genético han producido plantas y animales muy superiores a la fauna y flora originales. Estos programas de mejoramiento son de largo aliento y difíciles de implementar, debido a varias razones, entre las cuáles se puede mencionar, necesidad de personal altamente especializado y alto costo de las técnicas y metodologías utilizadas, entre otras (Helm *et al.*, 2006). Sin embargo, con el descubrimiento de Watson y Crick en 1953, que el ácido desoxiribonucleico (ADN) constituía el material genético de los seres vivos, y el posterior desciframiento del código genético, y con el aporte de biólogos, genetistas, químicos, ingenieros, etc., los conocimientos obtenidos por las ciencias básicas, se comenzaron a utilizar en la generación de nuevas tecnologías, dando lugar a la creación de una nueva disciplina, denominada biotecnología. Existen muchas interpretaciones y definiciones de esta disciplina, en este estudio, se utiliza la definición recomendada por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), a manera de uniformizar este concepto a nivel internacional, y que dice: «*la aplicación de Ciencia y Tecnología a organismos vivos, así como a partes, productos y modelos derivados de ellos, para modificar organismos vivos o materiales no vivos, para la producción de conocimientos, bienes y servicios*».

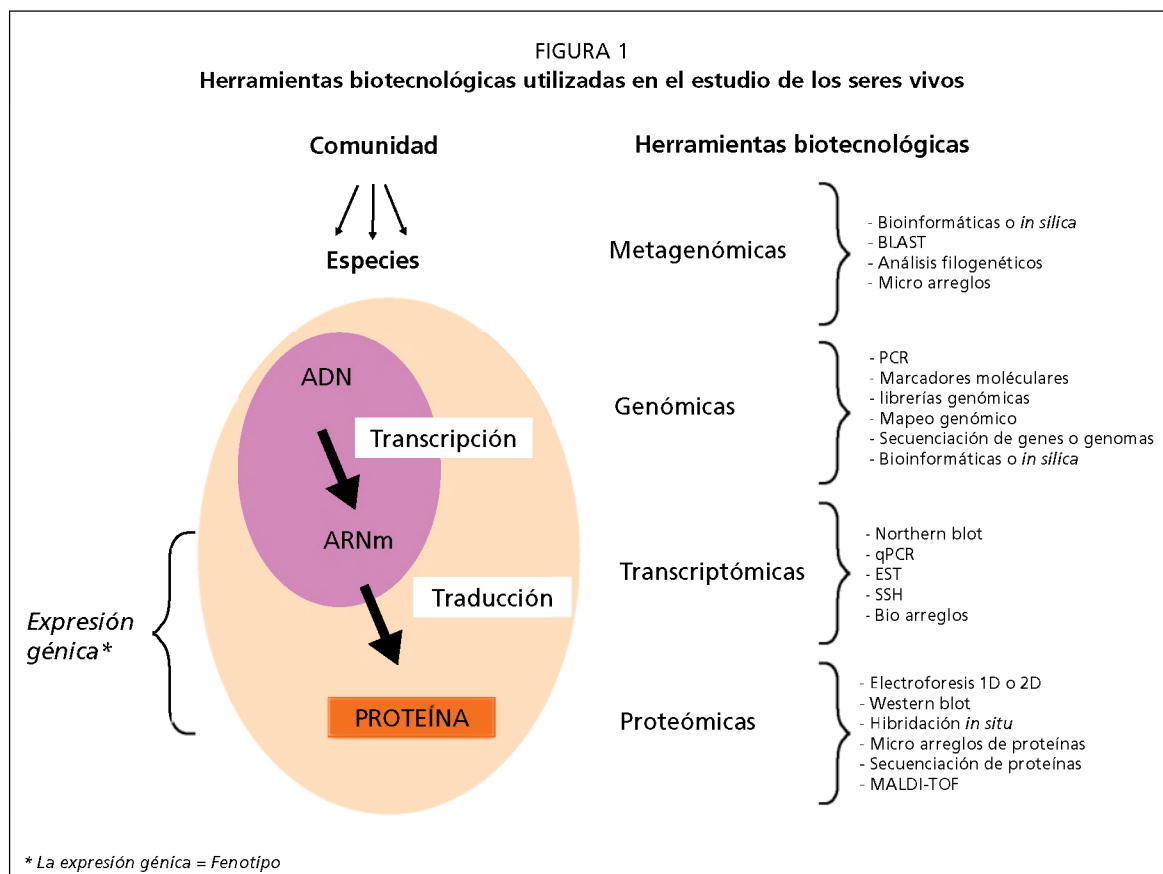
En el presente trabajo se revisan las diferentes herramientas biotecnológicas que se aplican actualmente y/o podrían utilizarse en el futuro cercano para el cultivo de los bivalvos. El conocimiento de la estructura genómica, funcionamiento y evolución de los bivalvos es actualmente limitada, pero con la optimización y aplicación de las tecnologías de la genómica, transcriptoma y la proteómica, se puede dar por cierto, que se incrementará exponencialmente en los próximos años.

Herramientas biotecnológicas

Las herramientas biotecnológicas están revolucionando nuestro entendimiento de los seres vivos a todos los niveles (Van Straalen y Roelofs, 2006). En este estudio, y solamente basados en un criterio práctico, las herramientas biotecnológicas han sido categorizadas en cuatro grupos (Figura 1):

- **Metagenómicas:** son aquellas herramientas utilizadas para realizar estudios filogenéticos y de taxonomía molecular de las diferentes especies de bivalvos.
- **Genómicas:** son aquellas herramientas utilizadas para caracterizar el ADN genómico de bivalvos.
- **Transcriptómicas:** son aquellas herramientas utilizadas para caracterizar ácidos ribonucleicos (ARNm), biomolécula que se forma como producto de la transcripción y que junto con el proceso de traducción, se conoce como expresión génica.
- **Proteómicas:** son aquellas herramientas destinadas a caracterizar las proteínas en los bivalvos.

Las herramientas mencionadas anteriormente pueden ser utilizadas, para caracterizar, aislar, identificar e incluso modificar biomoléculas de cualquier ser vivo. Desde otra perspectiva, podrían ser clasificadas en a) *biotécnicas generales*; como son las de electroforesis que permiten aislar y caracterizar biomoléculas con carga eléctrica,



como los ácidos nucleicos y las proteínas, las de hibridación de ácidos nucleicos como Southern blot, las de amplificación de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las de secuenciación de ácidos nucleicos y proteínas, las inmunoquímicas como hibridación *in situ*, entre otras; b) biotécnicas de expresión *in vitro*, tales como las de Northern blot, etc. c) biotécnicas de expresión *in vivo*, tales como PCR tiempo real o cuantitativo (qPCR), Western blot, hibridación diferencial de colonias (SSH), «Motivos» de secuencias expresadas (Expressed Sequence Tag [EST]), MALDI TOF, etc. y finalmente las que se conocen como d) biotécnicas *in silico*, que también se conocen como herramientas bioinformáticas, entre las cuáles se puede mencionar; alineamientos de secuencias de biomoléculas (BLAST), tanto de ADN como de proteínas; bio-arreglos de ácidos nucleicos y proteínas; análisis de filogenia y taxonomía molecular, entre otras (Mullis y Faloona, 1987; Yergeny *et al.*, 2002).

Herramientas genómicas

La genómica en el caso de los metazoos involucra la caracterización de los genomas nucleares y del genoma mitocondrial, obteniendo información del orden de las secuencias de ADN de los individuos. El término «genomics» se acuñó en la década de los años 80, pero se hizo familiar con el proyecto de secuenciación del genoma humano (Rogers y Venter, 2005). Gracias al desarrollo de las técnicas de secuenciación de ADN, y a la posibilidad de almacenar información, en bases de datos de fácil acceso a todos los usuarios. Las herramientas genómicas tuvieron un crecimiento exponencial, con el desarrollo de la técnica de PCR. Con la optimización de estas técnicas de biología molecular, se ha podido estudiar el genoma de bivalvos. Aunque el conocimiento de la estructura y contenido genético del genoma de los bivalvos es muy limitado en comparación a otros invertebrados y a los vertebrados en general, se ha logrado determinar qué el contenido de ADN del genoma haploide de los bivalvos, fluctúa entre 0,65 picogramos a 5,4 picogramos, y se ubica en el rango medio de los establecidos para

los metazoos (Gregory, 2007). Por otra parte, el número de cromosomas haploides, fluctúa entre 10 a 23 y tienden a ser muy homogéneos en tamaño, lo cual hace difícil su caracterización por las técnicas tradicionales o clásicas de bandeado C o G, pues no permite diferenciar a los cromosomas entre sí (Saavedra y Bachere, 2006).

Respecto de la organización de las regiones no codificantes del genoma de los bivalvos, se tiene conocimientos que ADN repetido, ya sea de naturaleza satélite o interdispersas es común. Algunas familias de ADN satélite han sido caracterizados en mitílidos (Martínez-Lage *et al.*, 2005) y ostras (López-Flores *et al.*, 2004).

Al realizar una búsqueda en las bases de datos, con la palabra clave «bivalvia» se obtiene aproximadamente 80 000 entradas de secuencias nucleotídicas y aproximadamente 4 000 de secuencias proteicas. Estos valores encontrados son relativamente bajos, si se compara con los resultados obtenidos con el término «mollusca», por ejemplo, donde se obtiene aproximadamente 650 000 secuencias nucleotídicas, y aproximadamente 15 000 secuencias proteicas o con el término «teleostei», que representa a otro grupo de animales acuáticos como son los peces y con mas de 6 millones de secuencias nucleotídicas y aproximadamente 95 000 secuencias proteicas. (<http://www.ebi.ac.uk/>; www.ncbi.nlm.nih.gov).

Las secuencias nucleotídicas de los mitílidos, son predominantes, con un porcentaje de 45 por ciento, luego siguen los ostreídos (29%), principalmente representados por *Crassostrea virginica* y *Crassostrea gigas* y con valores muy próximos los pectínidos con un 22 por ciento (Figura 2). Los menos estudiados desde un punto de vista genómico, corresponde a los «clams» (4%). Esta distribución de las secuencias de bivalvos, difiere de los datos encontrados por Saavedra y Bachere (2006), debido principalmente a los programas de secuenciación de genomas mitocondriales, que se están realizando en la actualidad y demuestra lo dinámico de esta disciplina. En gran medida, también, al bajo número de secuencias nucleotídicas representativas de los bivalvos en las bases de datos. Por otra parte, los genomas de mas de 300 organismos, han sido secuenciados y es sólo el comienzo, pues la eficiencia de las tecnologías de secuenciación se incrementa en forma periódica (Margulies *et al.*, 2005).

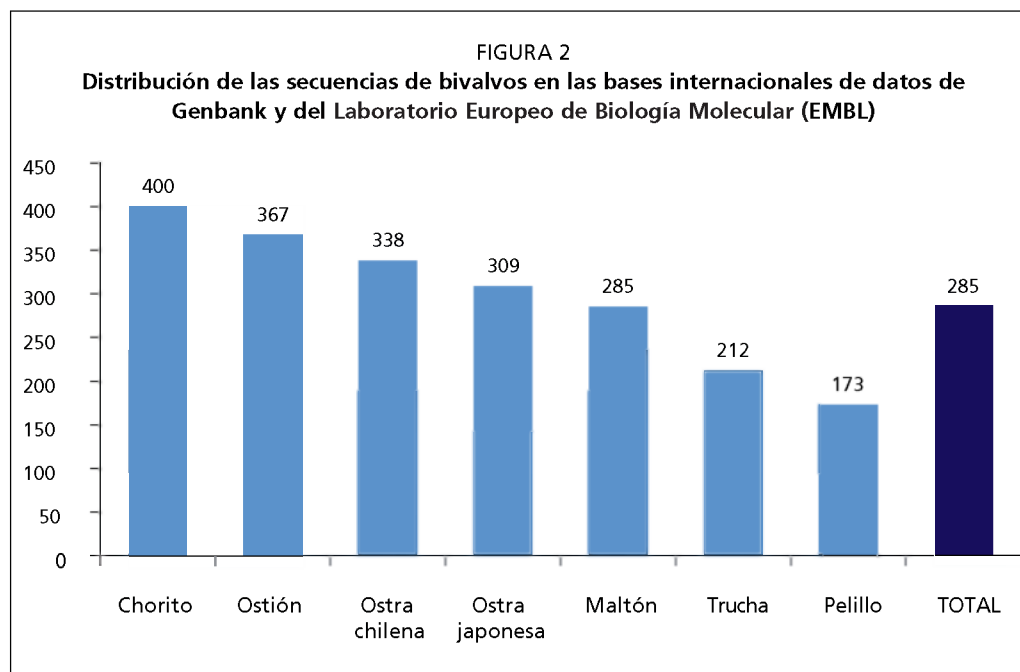
En el ámbito de los bivalvos, las iniciativas de secuenciación están recién comenzando, en el Cuadro 1, se presentan las iniciativas que actualmente se están o se han llevando a cabo por diversas instituciones, información obtenida de las bases de datos de Genbank y del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) European Bioinformatics Institute (EBI) databank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://www.embl.ebi.uk>). La mas avanzada al respecto, es el establecimiento de un consorcio para secuenciar la ostra del este, *Crassostrea virginica* (<http://www.marinegenomics.org/>). En el DOE Joint Genome Institute del Departamento de Energía (JGI) de los Estados Unidos de América, por otra parte, se está secuenciando el genoma mitocondrial de diversos organismos acuáticos, incluidas algunas especies de mitílidos (<http://www.jgi.doe.gov>).

CUADRO 1

Proyectos de secuenciación en bivalvos publicados en las bases de datos internacionales Genbank y EMBL

Ostras	La ostra del este, <i>Crassostrea virginica</i> , es abundante en la costa Este de los Estados Unidos de América y de valor comercial	Medical University of South Carolina http://www.marinegenomics.org/ University of Delaware, Estados Unidos de América http://www.ocean.udel.edu/index.shtml
Pectínidos	<i>Argopecten irradians</i> , es un bivalvo pectínido habitante de la región Este de los Estados Unidos de América y de importancia comercial	Marine Biological Laboratory. http://www.mbl.edu/marine_org/index.html
Almejas	<i>Spisula solidissima</i> se encuentra en el Océano Atlántico y es un bivalvo comercialmente importante	Marine Biological Laboratory http://www.mbl.edu/marine_org/index.html

Fecha de revisión: Septiembre, 2007.



El genoma mitocondrial de los bivalvos es de particular interés debido a que presentan dos tipos de genomas, denominados F y M, siendo los machos heteroplásmicos y las hembras homoplásmicas para el genoma F (Zouros, 2001). El genoma mitocondrial de prácticamente una docena de bivalvos ha sido secuenciado. En la Cuadro 2, se describe la información disponible respecto de la organización y estructura mitocondrial de los bivalvos. A pesar de ser muy pocos los genomas secuenciados, es relevante la gran

CUADRO 2

Organización de genoma mitocondrial en bivalvos de acuerdo a información publicada en las bases de datos internacionales Genbank y del Laboratorio Europeo de Biología Molecular

Genoma mitocondrial	% G+C	% Codificante	Topología	Tamaño (nt)	N° Genes	Institución	GenBank
<i>Crassostrea virginica</i>	30	55	ADN circular	17 243	12	Univ. of Delaware, USA	AY905542
<i>Crassostrea gigas</i>	36	59	ADN circular	18 224	12	Inje Univ., South Korea	AF177226
<i>Mytilus edulis</i>	38	66	ADN Circular	16 740	12	DOE Joint Genome Institute, USA	AY484747
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	38	67	ADN circular	16 744	12	National and Kapodistrian University of Athens, Greece	AY497292
<i>Mytilus trossulus</i>	38	59	ADN circular	18 652	12	Universite du Quebec Canada	AY823625
<i>Argopecten irradians</i>	43	68	ADN Circular	16 221	12	Acadia University, Biology, Wolfville Canada	EU023915
<i>Placopecten magellanicus</i>	44	35	ADN Bi-circular	32 115	12	Acadia University, Biology, Wolfville Canada	DQ088274
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	44	52	ADN* lineal	20 414	11	Hokkaido Food Research Center, Japan	AB271769
<i>Venerupis (Ruditapes) philippinarum</i>	30	55	ADN circular	22 676	12	University of Tokyo, Japan	AB065375
<i>Acanthocardia tuberculata</i>	40	67	ADN circular	16 104	12	University of Vienna, Austria	DQ632743
<i>Hiatella arctica</i>	33	65	ADN circular	18 244	13	University of Vienna, Austria	DQ632742
<i>Lampsilis ornata</i>	37	69	ADN circular	16 060	13	University of California, USA	AY365193

* cuatro fragmentos

Fecha de revisión: Septiembre, 2007.

variabilidad observada, respecto de la topología y organización del ADN mitocondrial, lo cuál difiere en gran medida de otros organismos animales, pues es posible encontrar desde ADN lineal, como es el encontrado en los pectínidos *M. yessoensis*, hasta ADN bicircular en *Placopecten magellanicus*. El tamaño del ADN mitocondrial fluctúa entre 16 060 nucleótidos (nt) para *L. ornata* y 32 115 nt para *Placopecten magellanicus*. Por otra parte, el número de genes también es variable fluctuando entre 11 para *M. yessoensis* y 13 para *H. artica* y *L. ornata* (Tabla 2). Es importante mencionar, que fueron encontradas algunas secuencias mitocondriales de *Mytilus chilensis*, en las bases de datos pero corresponden a secuencias incompletas de algunos genes. Iniciativas de secuenciación de genomas, ya sea nucleares o mitocondriales de bivalvos que correspondan a países latinoamericanos no fueron encontradas, aunque se hicieron búsquedas exhaustivas en todas las bases de datos de secuencias disponibles públicamente.

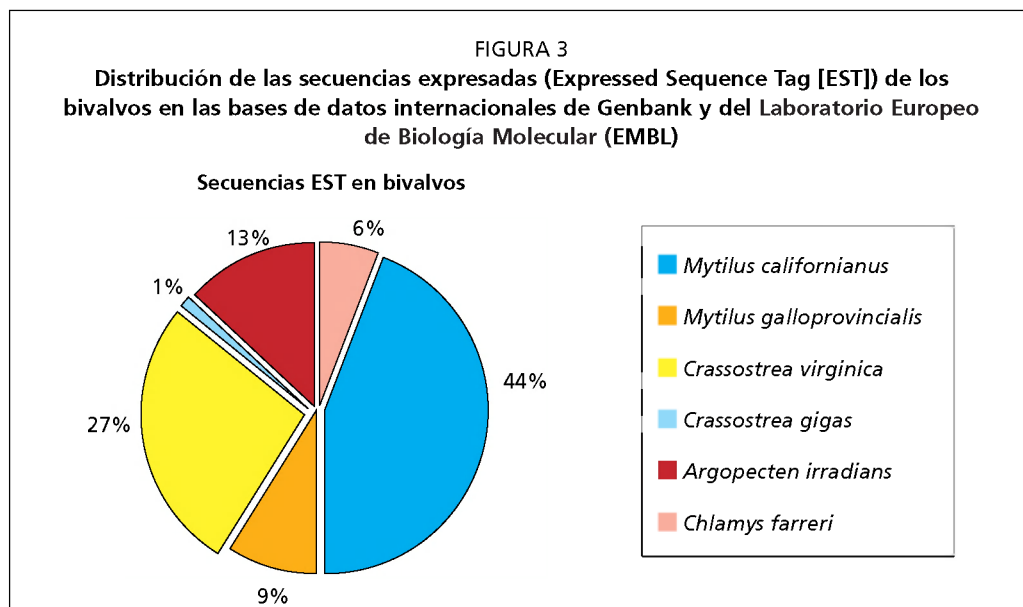
En esta revisión, se dará un mayor énfasis a las herramientas biotecnológicas, relacionadas con el estudio de los patrones de expresión molecular a nivel de ARN mensajero (ARNm) (transcriptoma) y proteínas (proteómica), pues constituyen el complemento imprescindible para descifrar y comprender la función de los genes que conforman el genoma de los seres vivos.

Herramientas transcriptómicas

Entre las técnicas clásicas que han permitido incrementar durante décadas el conocimiento de las funciones génicas, se encuentra el Northern blot. Estas metodologías, hoy en día son menos utilizadas pero no dejan de tener importancia. Aunque su aplicación llevan implícitas desventajas, tales como: el tiempo que consumen, el número limitado de muestras que se pueden analizar en cada experimento, su reproducibilidad, la fiabilidad de la cuantificación y la necesidad de conocer, en algunos casos la secuencia de los genes en estudio. Por estas razones, los científicos han abordado, avanzado y perfeccionado los métodos para el estudio comparativo de la expresión génica en cuanto al análisis de la representatividad del ARNm en células y tejidos, desarrollando nuevas tecnologías, tales como: a) Expresión diferencial. b) EST. c) Tecnología de Bio-arreglos (ADNc, ADN genómico, oligonucleótidos y proteínas). Estos métodos novedosos, han sido desarrollados para el análisis en gran escala de la expresión génica a nivel de ARNm y proteínas, por lo que permiten hacer un estudio comparativo en las poblaciones y, conocer la diferencia de expresión génica entre muestras diferentes, pero relacionadas en su origen. De todas estas tecnologías las menos costosas son: la expresión diferencial y SSH, las cuales son de fácil acceso para laboratorios pequeños y con pocos recursos. Por el contrario, los EST y los bio-arreglos, necesitan un desarrollo tecnológico integral para su eficiente y confiable aplicación.

- a) Expresión diferencial. Esta técnica ha sido utilizada para investigar en el ámbito de patologías que afectan a los moluscos, en el grupo español de Antonio Villalba del Centro de Investigaciones Marinas de Galicia (Da Silva *et al.*, 2005; Villalba *et al.*, 2005). El ARNm extraído es básicamente procesado mediante la reacción de transcripción reversa, utilizando la técnica de PCR cuantitativa.
- b) EST. Un porcentaje muy bajo del genoma de los organismos superiores corresponde a secuencias que codifican proteínas (aproximadamente un 10 por ciento). Esta tecnología alberga un gran valor por la posibilidad de descubrir nuevos genes y mapear sus posiciones en los cromosomas. Su aplicación permite, además, determinar el perfil de expresión génica de una célula o un tejido en estudio, los cuales definen sus características biológicas básicas.

En la Figura 3, se muestra la distribución de las secuencias EST obtenidas de las diferentes especies de bivalvos. Principalmente los mitílidos, ostreídos y pectínidos han sido estudiados con esta herramienta, y se encuentra relacionado con la secuenciación de los genomas mitocondriales, anteriormente descritas. Estos resultados no concuerdan con lo descrito por Saavedra y Bacher



(2006), cuando los ostreídos, eran los más estudiados y orientados a dilucidar la expresión a la resistencia o susceptibilidad de enfermedades en distintas condiciones ambientales. Por otra parte, son muy interesantes, los resultados obtenidos recientemente por el grupo de Dennis Hedgecock de la Universidad de Southern California, Estados Unidos de América, respecto de estudiar la heterosis o el vigor híbrido mediante estudios de transcriptoma en larvas de ostras, asociando las herramientas de EST a una de secuenciación masiva de megaclonos denominada MPSS (Hedgecock *et al.*, 2007). En una estrategia similar a la utilizada por Huvet *et al.*, (2004), de utilizar secuencias EST que fueron obtenidas en forma posterior a la utilización de SSH de RNAs, obtenidos de manto y gónadas orientada a estudiar la resistencia/susceptibilidad, al fenómeno de mortalidad de verano de ostras del Pacífico.

- c) Tecnología de los Bio-arreglos. Esta tecnología permite conocer la expresión génica diferencial a través de la cuantificación de la expresión de genes durante diferente estados fisiológicos. Los bio-arreglos ofrecen ventajas evidentes en relación con las demás tecnologías explicadas con anterioridad en este capítulo. Estas ventajas están dadas por el hecho que los bioarreglos son menos laboriosos, más sensibles, no necesitan del conocimiento previo de las secuencias génicas en estudio y, sobre todo, tienden cada vez más a miniaturizarse y a contener mayor cantidad de genes por área. Hasta la fecha se han desarrollado dos formas de realizar las bio-arreglos: los macro y los microarreglos, clasificación que está relacionada con el número de muestras en los soportes, el diámetro del «spot» y el tipo de soporte sobre el cual se organicen las biomoléculas sometidas a tamizaje. El consorcio «Affymetrix» (Santa Clara, Estados Unidos de América) es pionero en la fabricación de biochips comerciales de ADN (www.affymetrix.com). Aunque, en la actualidad, tanto en los países Europeos, como en Norteamérica, no existen biochips comerciales específicos para el estudio de expresión génica en bivalvos. Sin embargo, una colaboración internacional se ha establecido entre laboratorios de Francia y Estados Unidos de América para producir microarreglos que contengan sobre los 6 000 ADNc en ostras, principalmente *C. virginica* y *C. gigas* y el patógeno de la ostra *P. marinus* (Hedgecock *et al.*, 2005).

El desarrollo de la bioinformática, por otra parte, es crucial para la interpretación de los resultados, que se obtienen tanto con la tecnología de los bio-arreglos como las transcriptómicas en general. La bioinformática tiene por función servir como una herramienta de búsqueda y alineación de secuencias génicas obtenidas de las bases de

datos, esto se denominó BLAST (del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*) en un comienzo. Estas técnicas, han sido utilizadas en el área genómica para el análisis de secuencias y estudios de filogenia molecular, tanto en los países desarrollados como en algunos laboratorios de investigación de bivalvos de países tales como Brasil, Chile y México, sin embargo, no han sido utilizadas en los países latinoamericanos para el estudio y caracterización de la transcripción o como herramientas transcriptómicas, en gran medida porque las tecnologías de PCR cuantitativo o qPCR son relativamente recientes.

Herramientas proteómicas

Las técnicas proteómicas han sido aplicadas por diversos grupos de investigación, en varios países tales como España, Japón, China, Australia, Francia, Canadá y Estados Unidos de América entre otros. El estudio de los factores que afectan la calidad comercial de los mitílidos, en particular *M. galloprovincialis* y *M. edulis*, han sido estudiadas por el grupo español de López y colaboradores, encontrándose diferencias significativas en los patrones de expresión. También han sido utilizadas para la caracterización genética de especies de bivalvos y la caracterización de proteínas específicas de los estadios larvales (López *et al.*, 2002; López *et al.*, 2005). En Suecia, en la Universidad de Estocolmo y Upsala, se han optimizado diferentes estrategias proteómicas en *M. edulis*, para estudiar la contaminación ambiental marina que afecta a los bivalvos, utilizando herramientas de electroforesis bidimensional (2D), cromatografía líquida y espectrometría de masa (MS), encontrándose patrones específicos de expresión proteica en aquellos individuos expuestos a contaminación derivada de compuestos xenobióticos, petróleo, entre otros (Amelina, *et al.*, 2007; Mi *et al.*, 2007). Por su parte, Diz y Skibinski (2007), de la Universidad de Swansea en Inglaterra, están utilizando herramientas proteómicas, para entender fenómenos evolutivos en regiones híbridas de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*. En Francia y China, se están estudiando los procesos de biomineralización de las conchas y formación de perlas en los bivalvos (Marie *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2003). En los países latinoamericanos, solamente en Brasil, se han utilizados estas herramientas para entender la expresión génica de los bivalvos. Sin embargo, es interesante mencionar que en Chile, aunque no se han utilizado herramientas proteómicas propiamente tales, se ha trabajado en la caracterización y utilización de proteínas aisladas del biso de *Choromytilus*, con propiedades bioadhesivas y en la caracterización de biopéptidos aislados de *Mytilus chilensis* y que poseen actividad antimicrobiana (Mercado *et al.*, 2005).

El proteoma de un organismo tiene un carácter dinámico, pues la expresión de proteínas cambia en diferentes etapas del ciclo celular y también en respuesta a acciones externas a diferencia del genoma que es esencialmente constante a lo largo de su vida. En los mamíferos y otros organismos eucarióticos el gen que codifica una proteína, no está constituido por una secuencia continua de nucleótidos, se denominan genes divididos porque poseen una región codificante (exones) y otra no codificante (intrones). El fenómeno de *splicing* o de empalme, consiste en que los exones, pueden reordenarse de varias formas y dar lugar a más de una proteína a partir de un solo gen. De manera distinta a lo planteado por el paradigma de la biología que prevaleció durante el siglo pasado: UN GEN \Rightarrow UNA PROTEÍNA. Otro evento importante, es el hecho que una proteína puede ser modificada durante o después de la traducción o síntesis de la proteína, en un proceso que se conoce como modificación post traduccional.

La proteómica se basa en la separación, caracterización e identificación de muchas proteínas (en el orden de mil o más) simultáneamente. Entre las técnicas que utiliza se pueden mencionar: a) Electroforesis 2D. Los geles bidimensionales permiten obtener un arreglo o despliegue físico en dos dimensiones de mezclas complejas de proteínas, basados en i) la separación por carga eléctrica (focalización isoelectrica, IEF), es decir su punto isoelectrico y ii) la separación por tamaño molecular que se efectúa en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE); b) Cromatografía líquida. La electroforesis bidimensional

posee algunas limitaciones, para analizar proteínas hidrofóbicas, ya que por su escasa solubilidad están subrepresentadas. Por tales motivos, en los últimos años ha existido la tendencia a trabajar, con los péptidos, en vez de las proteínas, tratando de solucionar las limitaciones señaladas. La cuantificación se logra mediante un análisis detallado de las distribuciones de los péptidos analizados y así se infiere la expresión diferencial de las proteínas que los contienen. c) Espectrometría MS. La espectrometría, es la herramienta más empleada en los estudios de proteómica para la identificación de las proteínas. En la década de los 80, Fenn *et al.* (1989), describe la aplicación de la ionización por electrospray (*electrospray ionization*, ESI), al estudio de péptidos, proteínas y otras biomoléculas. Un año antes, Tanaka *et al.* (1988), había publicado un nuevo método de ionización conocido como MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*). Estos dos métodos, revolucionaron completamente la aplicación de la espectrometría de masas a las biomoléculas y en apenas diez años, la espectrometría de masas, se convirtió en un método poderoso para el análisis y la caracterización de proteínas y péptidos.

CONCLUSIONES

Las herramientas biotecnológicas, en particular, las genómicas, transcriptómicas y proteómicas se están utilizando principalmente en los países desarrollados, para entender y resolver los problemas de metabolismo, nutrición y reproducción, relacionados con el cultivo de bivalvos. Sin embargo, es necesario entender que son «herramientas», por lo tanto, deberían estar adscritas a programas de mejoramiento y manejo de los recursos acuícolas. En ese aspecto, es necesario pensar en aplicar estrategias similares a las desarrolladas para otros animales, que han desarrollado eficientes programas de manejo genético.

Por otra parte, también se aprecia que existe una gran deficiencia en la utilización de estas herramientas para el cultivo de bivalvos en los países latinoamericanos, principalmente en lo relacionado a la carencia de iniciativas de secuenciación de genomas y en falta de utilización o aplicación de herramientas transcriptómicas y proteómicas, para resolver problemas relacionados con el manejo sustentable de los recursos.

Finalmente, para los países latinoamericanos es fundamental establecer redes de cooperación internacional, para hacer una mejor utilización de estas herramientas biotecnológicas y ello no debería ser difícil de implementar, por las existencias de bases de datos internacionales de acceso abierto y por herramientas online que favorecen las comunicaciones y la transferencia de información en forma expedita.

BIBLIOGRAFÍA

- Amelina, H., Apraiz, I., Sun, W. y Cristobal, S. 2007. Proteomics-based method for the assessment of marine pollution using liquid chromatography coupled with two-dimensional electrophoresis, *J Proteome Res.*, (6): 2094–2104.
- Da Silva, P. M., Fuentes, J. y Villalba, A. 2005. Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on growing in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). *Marine Biology*, 147: 965–977.
- Diz, A.P. y Skibinski, D.O. 2007. Evolution of 2-DE protein patterns in a mussel hybrid zone. *Proteomics*, 7: 2111–2120.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. y Whitehouse, C.M. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomoléculas, *Science*, 246: 64–71.
- Ferreira, M.A. y Grattapaglia, D. 1995. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética* (2nd ed.) Embrapa.
- Gregory, T.R. 2007. Animal genome size database – <http://www.genomesize.com>.
- Hedgecock, D., Gaffney, P., Gouletquer, P., Guo, X., Reece, K. y Warr, G.W. 2005. The case for sequencing the oyster genome. *J. Shellfish Res.*, (24): 429–442.

- Hedgecock, D., Lin, J., Decola, S., Haudenschild, C., Meyer, E., Manahan, D. y Bowen, B. 2007. Transcriptomic analysis of growth heterosis in larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *PNAS.*, 104(7): 2313–2318.
- Helm, M.M., Bourne, N. y Lovatelli, A. 2006 Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. *FAO Documento Técnico de Pesca*. No. 471. Roma, 184 pp.
- Huvet, A., Herpin, A., Degremont, L., Labreuche, Y., Samain, J.-F. y Cunningham, C. 2004. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality. *Gene*, 343: 211–220.
- Kettman, J., Coleclough, C., Frey, J. y Lefkovits, I. 2002. Clonal proteomics: One gene-family of proteins. *Proteomics*, 2: 624–631.
- López, J.L., Marina, A., Alvarez, G. y Vázquez, J. 2002. Application of proteomics for fast identification of species-specific peptides from marine species. *Proteomics*, 2: 1658–1665.
- López-Flores, I., de la Herrán, R., Garrido-Ramos, M.A., Boudry, P., Ruiz-Rejón, C. y Ruiz-Rejón, M. 2004. The molecular phylogeny of oysters based on satellite DNA related to transposons. *Gene*, 339: 181–188.
- López, J.L., Abalde, S.L. y Fuentes, J. 2005. Proteomic approach to probe for larval proteins of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biotechnol.*, (7): 396–404.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S. y Bader, J.S. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437: 76–380.
- Marie, B., Luquet, G., Pais De Barros, J.P., Guichard, N., Morel, S., Alcaraz, G., Bollache, L. y Marin, F. 2007. The shell matrix of the freshwater Mussel *Unio Pictorum* (Paleoheterodonta, Unionoida). Involvement of acidic polysaccharides from glycoproteins in Nacre mineralization. *FEBS J.*, (274): 2933–2945.
- Martínez-Lage, A., Rodríguez-Fariña, F., González-Tizón y Méndez, J. 2005. Origin and evolution of *Mytilus* mussel satellite DNAs. *Genome*, 8: 247–256.
- Mercado, L., Schmitt, P., Marshall S. y Arenas, G. 2005. Gill tissues of the Mussel *Mytilus edulis chilensis*: A new source for antimicrobial peptides. *Electronic J. of Biotechnology*, 8(3): 284–290. (<http://www.ejbiotechnology.info>).
- Mi, J., Apraiz, I. y Cristobal, S. 2007. Peroxisomal proteomic approach for protein profiling in blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to crude oil. *Biomarkers*, 12: 47–60.
- Mullis, K. y Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*, (55): 335–350.
- Rogers, Y. y Venter, J. 2005. Genomics: massively parallel sequencing. *Nature*, 437: 326–327.
- Saavedra, C. y Bachère, E. 2006. Bivalve genomics. *Aquaculture*, 256: 1–14.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y. y Yoshida, T. 1988. Protein and polymer analysis of up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (2): 151–153.
- Van Straalen, N. y Roelofs, D. 2006 *An introduction to ecological genomics*. Oxford University Press, Oxford.
- Villalba, A., Casas, S.M., López M.C. y Carballal, M.J. 2005. Study of the perkinsosis of the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and association with clam mortality. *Diseases of Aquatic Organisms*, 65: 257–267.
- Yergey, A.L., Coorsen, J.R., Backlund, P. Jr., Blank P.S., Humphrey, G.A., Zimmerberg, J., Campbell, J.M. y Vestal, M.L. 2002. De novo sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF. *J Am Soc Mass Spectrom.*, (13): 784–791.
- Zhang, Y., Meng, Q., Jiang, T., Wang, H., Xie, L. y Zhang, R. 2003. A novel ferritin subunit involved in shell formation from the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comp. Biochem. Physiol. B.*, (135): 43–54.
- Zouros, E. 2001. The exceptional mitochondrial DNA system of the mussel family Mytilidae. *Genes Genet. Syst.*, (75): 313–318.