

Evaluación de la calidad ambiental de ecosistemas acuáticos en el entorno del Parque Nacional de Doñana

Osuna-Jiménez, Inmaculada; Fernández-Cisnal, Ricardo; Abril, Nieves; Vioque-Fernández, Amalia; Prieto-Álamo, M^aJosé; López-Barea, Juan; Pueyo, Carmen

Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba. Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, CeIA3. Rabanales, edificio C6 2^a planta. 14071 Córdoba. España

El cangrejo rojo americano *Procambarus clarkii* ha venido siendo regularmente utilizado como bioindicador de contaminación ambiental. Este estudio busca identificar nuevos biomarcadores moleculares mediante la aplicación integradora de diversas metodologías ómicas, evitando el sesgo asociado a los marcadores convencionales. Las dificultades inherentes al hecho de trabajar con organismos como *P. clarkii*, de gran interés ambiental pero escasamente representados en las bases de datos y, además, alejados filogenéticamente de cualquier organismo modelo, han sido resueltas utilizando la técnica de hibridación sustractiva por supresión (SSH) para el análisis de los perfiles de expresión diferencial de transcritos, y la tecnología 2D-Difference Gel Electrophoresis (2D-DiGE) para la cuantificación de las variaciones en los niveles de proteínas. Se han estudiado dos zonas (Matochal, MAT y Partido, PAR) externas y próximas al Parque Nacional de Doñana, en las cuales se desarrolla una intensa agricultura. Como zona de referencia se eligió la Laguna del Palacio (LP), en el corazón de la Reserva Biológica de Doñana.

Mediante SSH se obtuvieron cuatro genotecas que permitieron identificar los genes para los cuales hay mayor nivel de transcritos en las zonas contaminadas MAT y PAR o en la zona de referencia LP. Se secuenciaron cerca de 150 clones de cada genoteca, que se correspondieron con un total de 44 ESTs diferentes. De éstas, 26 (59%) se identificaron mediante comparación con las bases de datos. De las 18 restantes (41%), 14 no presentaron homología con ninguna secuencia y 4 se correspondieron con secuencias anotadas pero no identificadas con proteínas. Las secuencias identificadas pertenecen a genes relacionados con respuesta a estrés en general y con la respuesta inmune en particular, como el caso de *hemocianina-2*, una profenol-oxidasa que se activa proteolíticamente convirtiéndose en un inductor de la inflamación. El análisis proteómico de las muestras mediante 2D-DiGE reveló diferencias significativas en 15 spots, correspondientes a un total de 11 proteínas distintas, de las cuales 7 vieron sus niveles elevados en las zonas contaminadas y 4 disminuyeron. Se encontraron coincidencias con los datos transcriptómicos en el caso de las proteínas *hemocianina* y *ferritina*.

La integración de los resultados de ambas aproximaciones permitirá evaluar mejor cómo responde este bioindicador a la contaminación presente en el ecosistema en que viven. Esas respuestas se pueden utilizar como biomarcadores moleculares para el seguimiento y la evaluación de la calidad ambiental.

Financiación MICINN; Referencia del proyecto CTM2009-12858-C02-02