

Inmunotecnología aplicada al campo marino

S. Lorenzo Abalde^{1,2*}, E. Garet^{2*}, D. Pérez^{2*}, J.M. Fuentes González¹, Á. González-Fernández²

¹Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA), Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Xunta de Galicia. Vilanova de Arousa, Pontevedra, Spain.

²Área de Inmunoloxía, Facultade de Bioloxía, Edificio de Ciencias Experimentais, Universidade de Vigo. Vigo, Pontevedra, Spain.

*Han contribuido en igual medida en la realización de este trabajo

IMMUNOTECHNOLOGY APPLIED TO THE MARINE FIELD

Recibido: 13 Noviembre 2006

Aceptado: 28 Noviembre 2006

RESUMEN

Gracias a sus innumerables aplicaciones, la innovadora técnica de producción de anticuerpos monoclonales (AcsMo) diseñada por los Dres. Köhler y Milstein en 1975 ha revolucionado no sólo el campo biomédico, sino a diversos ámbitos científicos. Aquí mostramos algunos ejemplos de su aplicación en los campos de la Biología y Ecología marinas. España es una potencia mundial en cuanto a producción mejillonera, y cuenta con importantes explotaciones de otras especies de bivalvos. Con el fin de optimizar el rendimiento de esta actividad existen al menos tres aspectos en los que la Inmunotecnología promete ser una herramienta de gran utilidad: 1) Los problemas asociados a las toxinas marinas producidas por floraciones de microalgas tóxicas, obligando al cese de la extracción de bivalvos. Los riesgos podrían ser minimizados mediante una mejora en la monitorización de estos episodios con ayuda de los AcsMo. 2) Detección de toxinas en los bivalvos. El método más utilizado internacionalmente es el bioensayo (inyección de ratones con extractos de bivalvos), pero se están buscando métodos alternativos utilizando AcsMo frente a algunas de las toxinas. 3) Desarrollo de técnicas inmunológicas que permitan la discriminación rápida y fiable de las larvas de mejillón y las larvas de otras especies de bivalvos (muy semejantes morfológicamente). Esto permitiría asesorar al sector mejillonero para optimizar la obtención de cría de mejillón. Así, la Inmunotecnología abre enormes posibilidades en el campo marino, como son la discriminación de especies, mejora de la acuicultura, control de toxinas, estudios ecológicos, o el estudio del sistema inmune de diversos organismos marinos.

PALABRAS CLAVE: Anticuerpos monoclonales/ Mejillones/ Toxinas marinas/ Inmunoensayo.

ABSTRACT

Thanks to its innumerable applications, the innovative technique of monoclonal antibodies (mAbs) developed by Köhler and Milstein in 1975 has revolutionized not only the biomedical field, but also other sciences. Here, we show some examples of its potential application in Marine Biology and Ecology, especially in the mussel sector and with marine toxins. Spain is an important world producer of mussels and other bivalves, such as oysters and clams. There are at least three aspects in which immunology promises to be a powerful tool for helping to optimize the yield of this activity. These are related to: 1) The problems associated with the marine toxins produced during blooms of toxic microalgae species, which force a halt in the production of bivalves. The use of mAbs to improve the monitoring of toxic algae blooms could minimize such problems. 2) The detection of toxins in the bivalves. Although the most commonly used method, internationally, is a bioassay (injection of mice with bivalve extracts), immunoassays using mAbs against the toxins may be an alternative method. 3) The development of immunological techniques for an accurate identification of mussel larvae: the mAbs can distinguish mussel larvae from other bivalve larvae (very similar in morphology), allowing analysis of the spatio-temporal distribution of the larvae with the aim of optimizing the production of mussels. Moreover, the use of immunological techniques is helping to improve species discrimination, fishing control, the handling of aquaculture, toxin controls and ecological studies, such as those about the immune system of diverse marine organisms.

KEY WORDS: Monoclonal antibodies/ Mussel larvae/ Marine toxins/ Immunoassays.

INTRODUCCIÓN

La técnica de generación de anticuerpos monoclonales⁽¹⁾ revolucionó no sólo a la Inmunología sino a otros muchos ámbitos del saber, principalmente a la Biomedicina. Esta técnica permite obtener anticuerpos (Acs) homogéneos e idénticos entre sí, específicos frente a un determinado antígeno. El desarrollo de Acs monoclonales (AcsMo) ha tenido una enorme expansión, con un mercado internacional que mueve miles de millones de euros. El avance en las pruebas diagnósticas, aplicaciones terapéuticas, detección y purificación de innumerables compuestos, ha sido posible gracias a la generación y uso de estos agentes tan específicos y versátiles. Así mismo, este extraordinario potencial puede ser utilizado por muchos otros campos científicos. En esta revisión se muestran varias aplicaciones de las técnicas inmunológicas en el campo marino, como son la identificación de larvas de moluscos, de microalgas, la detección de biotoxinas, o el estudio de diversos organismos marinos.

MOLUSCOS

España es el primer productor europeo de mejillón y una potencia mundial después de China⁽²⁾. La producción gallega ronda las doscientas cincuenta mil toneladas anuales, lo que supone un 40% del mercado europeo. Por tanto, este sector tiene una gran relevancia socio-económica, y supone una facturación anual superior a los 100 millones de euros. El cultivo de mejillón se basa en el engorde de individuos juveniles (semilla) en estructuras flotantes llamadas bateas. Dichos juveniles se pueden obtener mediante raspado de rocas en costas expuestas al oleaje o usando cuerdas colectoras colgadas de las bateas, a las cuales se adhieren de forma natural (Fig. 1). Varios estudios aconsejan la utilización de cuerdas colectoras^(3,4), debido principalmente a que reducen el ciclo de cultivo, que suele ser de 2 años. Para optimizar este método y aconsejar al sector mejillonero, se necesita de un mayor conocimiento de la distribución de las larvas de mejillón. Con este motivo, la Xunta de Galicia puso en marcha un programa de seguimiento de la distribución espacial y temporal de las larvas de mejillón en el plancton de las rías gallegas. Este tipo de estudios conlleva el análisis periódico de gran cantidad de muestras de plancton en las que aparecen una gran variedad de larvas pertenecientes a distintas especies, como ostra, vieira, almeja, berberecho, navaja, etc. Debido a la gran similitud entre las larvas, especialmente en los primeros estadios de desarrollo, resulta difícil hacer una determinación precisa de las especies (Fig. 2). Se hace por tanto necesario un método de identificación rápido y fiable de las larvas presentes en las muestras de plancton.

Los métodos clásicos de identificación de larvas de



Figura 1. Comparación de los métodos de obtención de semilla de mejillón: Mediante raspado de rocas en las costas (izquierda) o mediante el uso de cuerdas colectoras sobre plataformas flotantes o bateas (derecha).



Figura 2. Similitud morfológica entre larvas de bivalvos, lo que impide su identificación precisa al microscopio óptico.

moluscos se realizan mediante observación microscópica⁽⁵⁻⁸⁾. Las primeras identificaciones se basaban en la observación de la adquisición de caracteres morfológicos presentes en adultos, lo que provocaba frecuentes errores^(9,10), hasta que se consiguieron cultivos larvarios uniespecíficos, pudiendo así definir características propias de cada grupo taxonómico en los estadios larvarios^(9,11). La forma y el número de dientes de la zona de apertura de la concha (charnela), zona de unión y bisagra entre las dos valvas, caracteriza a las larvas a niveles taxonómicos más bajos, pudiendo determinarse el género e incluso la especie⁽¹²⁾. La observación de las larvas bajo microscopio electrónico de barrido permite distinguir características ultraestructurales de la charnela con alta precisión, pero requiere una preparación y manipulación previa de la muestra^(13,14), y analizar larva a larva, lo que resulta excesivamente tedioso y limitado a la subjetividad y/o experiencia del identificador. La necesidad de procesar en un tiempo mínimo el elevado número de muestras complejas de plancton requeridas para los estudios de campo, hace imprescindible el desarrollo de técnicas alternativas que sean rápidas, específicas y cómodas⁽¹⁵⁾.

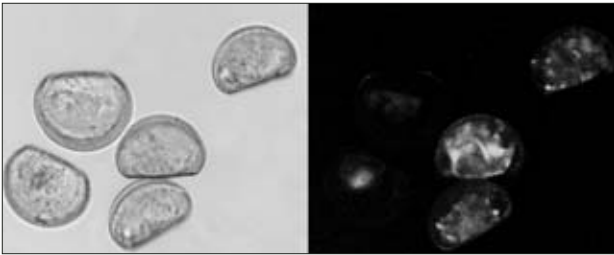


Figura 3. Discriminación de larvas de mejillón mediante el uso de anticuerpos monoclonales. Se observa una muestra compleja de plancton en microscopio óptico (izquierda) y en microscopio de fluorescencia tras tinción con un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente a larvas de mejillón (derecha).

El gran auge de la Biología Molecular, la Proteómica y la Inmunología en los últimos años, está siendo aprovechado por campos de estudios ajenos a la Biomedicina^(16,17), y grupos de investigación de todo el mundo están promoviendo nuevos métodos de identificación, basados en marcadores moleculares e inmunológicos. Tanto el estudio de marcadores proteicos, como el desarrollo de sondas específicas han mostrado ser herramientas útiles para el estudio filogenético de moluscos⁽¹⁸⁻²⁴⁾ pero siguen requiriendo el análisis individual o en pequeños grupos, lo que resulta laborioso y poco útil cuando se quiere aplicar el método a tareas rutinarias de monitorización⁽²⁵⁾.

La identificación inmunológica se basa fundamentalmente en el uso de Acs específicos. Varios grupos han optado por el desarrollo de Acs frente a larvas de diferentes especies de moluscos, bien sean policlonales^(26,27) o monoclonales⁽²⁸⁻³⁰⁾. Las técnicas inmunológicas son particularmente atractivas por su especificidad, sensibilidad y rapidez. La principal ventaja con respecto a las técnicas basadas en el análisis de proteínas o ADN es que se puede trabajar sobre un conjunto de organismos con el mínimo procesado de las muestras, manteniéndolos prácticamente intactos^(31,32). La posibilidad de acoplar a los Acs enzimas o fluorocromos sin alterar su sensibilidad y su capacidad de reconocimiento específico, convierte a los Acs en herramientas altamente versátiles, posibilitando su uso en técnicas como el inmunoensayo enzimático (ELISA), la inmunofluorescencia, o el «Western Blot», entre otros. La aplicación de los AcsMo obtenidos por nuestro grupo frente a larvas de mejillón^(29,30) facilita la discriminación de las mismas, distinguiéndolas de las larvas de otras especies de bivalvos (ostra, vieira, berberecho, zamburiña, almeja, navaja, etc.) (Fig. 3).

MICROALGAS

Desde hace años, las microalgas han sido el centro de estudio para muchos grupos de investigación. La principal

razón es su implicación en los fenómenos de mareas rojas tóxicas, que tienen graves consecuencias económicas y de Salud Pública, afectando de forma muy importante al sector acuicultor de bivalvos y en especial al cultivo del mejillón. La gran similitud morfológica entre las diferentes especies de fitoplancton dificulta su seguimiento mediante microscopía óptica. El tamaño de las microalgas es también un factor limitante y hace necesario el uso de microscopía electrónica, con todos los inconvenientes ya comentados anteriormente. Con el fin de solucionar este problema, diversos grupos han desarrollado Acs para la identificación de algunas especies de microalgas⁽³³⁻³⁷⁾. La gran similitud morfológica entre algas que producen toxinas, de aquéllas que no lo hacen, obliga a realizar estudios complejos de las muestras de plancton. El uso de anticuerpos dirigidos específicamente frente a las especies de algas productoras de toxina, permitiría una detección precoz de su sobrecrecimiento. Con objeto de detectar al dinoflagelado *Alexandrium minutum*, una de las principales microalgas involucradas en las mareas tóxicas, nuestro grupo ha desarrollado anticuerpos monoclonales capaces de reconocer al dinoflagelado mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta⁽³⁷⁾. El uso de anticuerpos en muestras de plancton permitiría la monitorización de dinoflagelados tóxicos, realizando una detección precoz del sobrecrecimiento de estos organismos, lo que se reflejaría en la mejora de la productividad del sector pesquero, posibilitando, por ejemplo, cosechar la máxima cantidad de molusco antes de verse afectado por la marea roja tóxica. Además de la determinación de su abundancia, la fácil discriminación de las algas por los AcsMo permite llevar a cabo diferentes estudios ecológicos, como por ejemplo el estudio de la predación por parte de los copépodos⁽³⁷⁾.

BIOTOXINAS

En las últimas dos décadas, los casos registrados de mareas rojas provocadas por el crecimiento explosivo de microalgas, algunas de ellas productoras de biotoxinas, se han incrementado a lo largo de todo el mundo⁽³⁸⁾. Este fenómeno no tiene efectos nocivos para los moluscos que se alimentan de fitoplancton, pero las toxinas son acumuladas en los tejidos de organismos filtradores como mejillón, almeja, ostra, y otros bivalvos, provocando la intoxicación de los consumidores finales, como peces, aves, o humanos.

Principalmente en las costas de Europa han sido identificados diversos dinoflagelados tóxicos⁽³⁹⁾. Los dinoflagelados del género *Dinophysis* producen ácido okadaico y derivados, que son toxinas diarreas tipo DSP

TABLA I. Tipos de toxinas marinas

Efecto	Tipos	Síntomas
Paralizantes (PSP)	Saxitoxina (STX) Neo-STX Gonyautoxinas (GNTX1-4) Decarbamoyl-STX Decarbamoyl-NeoSTX Decarbamoyl-GNTX1-4 Deoxydecarbamoyl-STX Deoxydecarbamoyl-NeoSTX Deoxydecarbomoyl-GNTX1-4	<i>Parálisis leve:</i> parestesia progresiva de brazos y piernas, vértigo y discurso incoherente <i>Parálisis moderada:</i> ataxia, descoordinación motora, somnolencia, y dificultades respiratorias <i>Parálisis grave e incluso muerte</i> por parálisis respiratoria Aparición de síntomas: 2-24 horas tras intoxicación
Amnésicas (ASP)	Ácido domoico Ácido Isodomoico A-H C5' Diasteromero	Náuseas, diarrea, vómitos, hipo, dolor de cabeza, pérdida de memoria, coma, calambres abdominales, confusión, mutismo, temblores, agresividad, tensión inestable y arritmia cardiaca. Ocasionalmente epilepsia e incluso muerte por necrosis neuronal Aparición de síntomas: 15 min-38 horas tras intoxicación.
Diarreicas (DSP)	Ácido okadaico y derivados Dinofisistoxinas (DTX1,2 y3) Pectenotoxinas (PTX1-4, 6 y 7)	Diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal. No letales Aparición de síntomas: 30 min-pocas horas tras consumo y desaparecen al tercer día
Neurotóxicas (NSP)	Brevetoxinas (PbTx 1-10) y análogos (BTX-B1 a B4)	Náuseas, vómitos, diarrea, sudores, entumecimiento, temblores, parálisis, arritmia, hipotensión, calambres, broncoconstricción, espasmos, coma. No letales Aparición de síntomas: 30 min-3 horas tras su ingestión y desaparecen a los pocos días

(diarreic shellfish poison), cuyos síntomas principales son dolor estomacal, vómitos y diarrea (Tabla I). Algunas especies del género *Alexandrium* son productoras de potentes neurotoxinas, tales como gonyautoxinas y saxitoxina, con más de 20 variantes identificadas, las cuales se clasifican en base al tipo de intoxicación que provocan como toxinas paralizantes o *paralytic shellfish poison* (PSP). Estas originan cuadros de intoxicación con síntomas leves, moderados o incluso graves (Tabla I). Si bien éstas son las neurotoxinas más potentes, especies del género *Gymnodinium* producen una familia de neurotoxinas conocidas como brevetoxinas, causantes de un envenenamiento no letal, llamado *neurotoxic shellfish poison* (NSP).

La producción de biotoxinas no está asociada solo a los dinoflagelados, ya que recientemente se han identificado 10 especies de diatomeas (*Pseudo-nitzschia spp.*) que producen ácido domoico^(40,41), causante de intoxicación tipo amnésica o *amnesic shellfish poison* (ASP) tanto en mamíferos marinos⁽⁴²⁾, como en aves^(43,44), y humanos⁽⁴⁵⁾.

La presencia de toxinas en el mar ocasiona grandes pérdidas económicas en varios países, entre ellos España, Japón, Nueva Zelanda, Hong Kong, Canadá y Dinamarca⁽⁴⁶⁾. El alto riesgo para la salud, tanto animal como humana, que

provocan estas toxinas ha obligado a las autoridades a crear programas de vigilancia en las áreas de producción y centros de control donde llevar a cabo análisis periódicos. Los métodos de análisis incluyen el bioensayo en ratón⁽⁴⁷⁾, estandarizado por la *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para saxitoxina y sus derivados, así como para el resto de las toxinas a excepción del ácido domoico, debido a que el límite de detección del bioensayo no es lo suficientemente bajo para cuantificar la concentración límite permitida para esta toxina. Por esta razón, para la monitorización de ASP se ha estandarizado la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) como método de referencia⁽⁴⁸⁾. A pesar de que el bioensayo en ratón es el procedimiento oficial más extendido en la mayoría de países, existe gran controversia por la alta variabilidad de sus resultados, su baja sensibilidad, y por la utilización de animales para este fin. Por todo ello, se están buscando métodos alternativos al bioensayo, como es la cromatografía (HPLC). Sin embargo, éste sigue siendo un método lento, requiere equipamiento específico y disponibilidad de patrones de toxinas puras de alto costo. Por estas razones se han propuesto métodos alternativos, que puedan ser más rápidos y fiables, como son métodos bioquímicos⁽⁴⁹⁾, técnicas fluorométricas^(50,51),

cromatográficas⁽⁵²⁾ y por último, y con gran éxito, la combinación de cromatografía líquida con la espectrofotometría de masas (LC-MS), aprobado por el Comité Europeo de Estandarización (CEN, 2002) para el estudio de las PSP. Sin embargo, aún existen graves problemas a la hora de distinguir los diferentes derivados de las toxinas. En este sentido, y gracias a la gran sensibilidad y especificidad que aportan los anticuerpos monoclonales, las técnicas inmunológicas prometen ser una herramienta útil. Desde hace más de 20 años se han propuesto diversos inmunoensayos enzimáticos (ELISAs) tanto indirectos⁽⁵³⁾ como competitivos⁽⁵⁴⁾ para la cuantificación de toxinas, que han demostrado tener una buena correlación con respecto tanto al bioensayo en ratón⁽⁵⁵⁾, como a la HPLC⁽⁵⁶⁾. Estas técnicas inmunoenzimáticas están siendo ya comercializadas para la detección individualizada de saxitoxina, ácido domoico, ácido okadaico y yessotoxina. La especificidad y alta sensibilidad aportada por los anticuerpos monoclonales en la detección y cuantificación de las biotoxinas promete ser la solución a los problemas de los métodos actuales de monitorización, y ya ha sido aprobado por la AOAC el ELISA para la detección de domoico como método alternativo al bioensayo.

OTROS ORGANISMOS MARINOS

La gran versatilidad de los anticuerpos monoclonales aplicados al ambiente marino no se limita sólo a las biotoxinas, sino que ha permitido el desarrollo de una amplia variedad de ensayos diagnósticos para la identificación de diferentes patógenos, tanto virus y bacterias, como hongos, que afectan a especies de interés comercial. Debido a la falta de tratamiento para las enfermedades que provocan, cada año se registran grandes epidemias en las empresas productoras de crustáceos y moluscos así como en piscifactorías, que diezman hasta el 80% de la población. En Japón, por ejemplo, las pérdidas anuales debido a enfermedades de este tipo ascienden a más de 11 millones de euros⁽⁵⁷⁾. Para evitar y controlar estas infecciones se han desarrollado distintos métodos diagnósticos en los que se usan anticuerpos monoclonales, dentro de los cuales se destaca el ELISA por su elevada sensibilidad, gran número de muestras procesadas, rapidez y sencillez. Desde hace varios años, se ha propuesto esta técnica para el diagnóstico de virus como el *Nodavirus spp*⁽⁵⁸⁾ que infecta larvas y juveniles de varias especies de peces marinos, el Yellow Head Virus (YHV), causante de mortalidad aguda en langostinos^(59,60), el causante del síndrome de Taura (TSV)^(61,62), o la infección por baculovirus⁽⁶³⁾.

En algunos casos, como para el White Spot Syndrome Virus (WSSV), se han llevado a cabo pruebas inmunológicas utilizando anticuerpos policlonales⁽⁶⁴⁻⁶⁷⁾ que mostraron ser

poco eficientes debido a las reacciones no específicas y falsos positivos. Sin embargo, el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos para proteínas de la cubierta del virus^(68,69), son útiles para el diagnóstico de infección viral incluso a bajas concentraciones del patógeno⁽⁷⁰⁾.

Recientemente se han desarrollado anticuerpos policlonales específicos para dos proteínas de la cápside del virus TSV (VP1 y VP3), mediante clonación y expresión de esos genes en *Escherichia coli*, usados luego como antígeno, como primer paso para la obtención de anticuerpos monoclonales específicos para estas proteínas⁽⁷¹⁾.

Además de ser útiles para el diagnóstico de patógenos virales, el uso de anticuerpos monoclonales también permite la detección de distintas especies de bacterias como el *Vibrio spp*^(72,73), la bacteria causante de la hepatopancreatitis necrotizante (NHP-B)⁽⁷⁴⁾ o dinoflagelados parásitos de langostas⁽⁷⁵⁾. En este último caso, se ha desarrollado un inmunoensayo enzimático para la detección de dinoflagelados que parasitan langostas en la costa de Escocia⁽⁷⁶⁾. La principal ventaja de esta técnica es que permite un análisis más rápido de un gran número de muestras, al mismo tiempo que aporta mayor sensibilidad y especificidad que otras técnicas aplicadas para el mismo fin⁽⁷⁷⁾.

Si bien la técnica inmunológica más extendida para la detección de patógenos es el ELISA, ésta no es la única. Así, por ejemplo, para el diagnóstico y cuantificación de iridovirus en peces marinos, se ha propuesto el empleo de la citometría de flujo. Otras técnicas, como la inmunohistoquímica, han sido utilizadas no solo para la detección de proteínas virales⁽⁷⁸⁾, sino también para conocer la patología secuencial y la distribución de las partículas virales en distintos tipos de infección⁽⁷⁹⁾.

No solo es interesante detectar al patógeno sino que en ocasiones también interesa valorar la respuesta inmunitaria del organismo infectado. Mediante ELISA es posible determinar los niveles de anticuerpos generados por algunos peces, específicamente dirigidos frente a un patógeno concreto^(80,81), o por citometría se puede cuantificar la proporción de linfocitos B tras su activación⁽⁸²⁾. Anticuerpos monoclonales dirigidos frente a hemocitos de moluscos han hecho posible estudiarlos, facilitar estudios ontogénicos y funcionales, valorar posibles efectos de la polución^(83,84) o permitir estudios comparativos entre distintas especies de bivalvos⁽⁸⁵⁾.

El uso de anticuerpos en la investigación marina no se centra exclusivamente en la detección de organismos o en el estudio de su sistema inmunitario, sino que otros sistemas también se benefician de esta herramienta. Así, por ejemplo, para entender el sistema óseo de peces, se han desarrollado anticuerpos que permiten estudiar la acumulación de dos proteínas involucradas en la osificación⁽⁸⁶⁾, o se ha clarificado

la invención en un modelo de cefalópodo gracias a estudios inmunohistoquímicos⁽⁸⁷⁾.

La tecnología de los anticuerpos resulta por tanto muy útil en la conservación y estudio de los organismos marinos, pero también en el control de la venta de productos derivados del mar. El elevado precio de algunas especies y la dificultad de identificarlas una vez procesadas para su consumo, hacen que éstas sean susceptibles de ser sustituidas por otras de menor coste o que se produzca una comercialización ilegal de ciertas especies. Todo esto hace necesario el desarrollo de métodos robustos para la identificación y/o determinación de la procedencia de un determinado producto, pudiendo evitar de este modo tanto la venta ilegal como el fraude. En este sentido, y junto al desarrollo de técnicas moleculares (PCR, estudio de microsátélites, etc.) y enzimáticas (análisis de alozimas), las técnicas inmunológicas pueden ofrecer, por ejemplo, la identificación específica del pez vela mediante ELISA en poco más de 30 minutos⁽⁸⁸⁾, o la discriminación de algunas especies comerciales de abulón con AcsMo e incluso a dos sub-especies usando suero de pacientes alérgicos⁽⁸⁹⁾. Con la misma finalidad se han desarrollado AcsMo frente a camarón de roca⁽⁹⁰⁾, y frente al pargo rojo⁽⁹¹⁾. Algunos de estos anticuerpos son eficaces incluso después de que el animal haya sido cocinado o ahumado, como en el caso del ELISA usado para discriminar pescados ahumados⁽⁹²⁾. Existen también anticuerpos que permiten discriminar el género de ciertos organismos, como es el caso de un anticuerpo que reconoce únicamente a las hembras de una especie de copépodo, lo que ha permitido identificar un antígeno diferencial entre macho-hembra⁽⁹³⁾.

CONCLUSIONES

Los AcsMo no han dejado de sorprendernos por su extraordinario potencial. «El padre de la Inmunología moderna», el Dr. César Milstein, nos dejó un legado de infinitas posibilidades. Como se muestra en esta revisión, la aplicación de los AcsMo en campos tan distantes al Biomédico, como es el caso de la Biología y Ecología Marinas, está permitiendo desarrollar numerosos estudios tanto básicos como aplicados, de extraordinaria importancia para la salud y consumo humanos. La Inmunotecnología ofrece múltiples posibilidades en el campo marino, lo que le augura un futuro lleno de retos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Xunta de Galicia por la financiación concedida, al grupo de Zooplancton de la Universidad de Vigo y a Darío Alves por su apoyo técnico.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

CORRESPONDENCE TO:

África González Fernández
 Área de Inmunología, Facultade de Bioloxía
 Universidade de Vigo
 Campus As Lagoas Marconsende,
 Fonte das Abeleiras, E-36310
 Vigo-Pontevedra, Spain
 Phone number: +(34) 986812625. Fax: +(34) 986812556
 E-mail: africa@uvigo.es

REFERENCES

1. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;**256**:495-497.
2. Labarta U, Pérez-Corbacho E. Producción y comercio del mejillón en el mundo. Análisis de 19 países. In: Labarta U (ed). *Bateiro, mar, mejillón. Una perspectiva bioeconómica*. Santiago, CIEF, Fundación Caixa Galicia, 2004;p.123-239.
3. Pérez-Camacho A, Labarta U, Beiras R. Growth of mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis*) on cultivation rafts: Influence of seed source, cultivation site and phytoplankton availability. *Aquaculture* 1995;**138**:349-362.
4. Fuentes J, Molares J, Villalba A. Growth, mortality and parasitization of mussels cultivated in the Ría de Arousa (NW Spain) from two sources of seed: Intertidal rocky shore vs. collector ropes. *Aquaculture* 1998;**162**:231-240.
5. Bernard F. Première note sur le développement et la morphologie de la coquille chez les lammellibranches. *Bulletin de la Société Géologique de France* 1895;**23**:104-154.
6. Stafford J. On the recognition of bivalve larvae in plankton collections. *Contributions to Canadian Biology and Fisheries* 1906-1910; 1912: 221-242.
7. Chanley P, Andrews JD. Aids for identification of bivalve larvae of Virginia. *Malacologia* 1971;**11**:45-119.
8. Hendriks IE, van Duren LA, Herman PMJ. Image analysis techniques: A tool for the identification of bivalve larvae? *J Sea Res* 2005;**54**:151-162.
9. Loosanoff VL, Davis HC, Chanley P. Dimensions and shapes of larvae of some marine bivalve mollusks. *Malacologia* 1966;**4**:351-435.
10. Lutz RA. Identification of bivalve larvae and postlarvae: A review of recent advances. *Am Malacol Bull* 1985;**1**:59-78.
11. Schweinitz EH, Lutz RA. Larval development of the northern horse mussel *Modiolus modiolus* (L.) including a comparison with the larvae of *Mytilus edulis* L. as an aid in planktonic identification. *Biol Bull* 1976;**150**:348-360.
12. Carriker MR. Bivalve larval research, in transition: a commentary. *J Shellfish Res* 1988;**7**:1-6.
13. Lutz RA, Hidu H. Hinge morphogenesis in the shells of larval and early post-larval mussels (*Mytilus edulis* L. and *Modiolus modiolus* L.). *J Mar Biol Ass UK* 1979;**59**:111-121.
14. Domínguez M, Alcaraz M. Larvas de moluscos lamelibranquios de la ría de Pontevedra: Metodología y sistemática. *Investigación Pesquera* 1983;**47**:345-357.

15. Garland ED, Zimmer CA. Techniques for the identification of bivalve larvae. *Mar Ecol Prog Ser* 2002;**225**:299-310.
16. Burton RS. Molecular tools in marine ecology. *J Exp Mar Biol Ecol* 1996;**200**:85-101.
17. Vrieling EG, Anderson DM. Immunofluorescence in phytoplankton research: applications and potential. *J Phycol* 1996;**32**:1-16.
18. Miller KM, Jones P, Roughgarden J. Monoclonal antibodies as species-specific probes in oceanographic research: examples with intertidal barnacle larvae. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1991;**1**:35-47.
19. Olson RR, Runstadler JA, Kocher TD. Whose larvae? *Nature* 1991;**351**:357-358.
20. Hu YP, Lutz RA, Vrijenhoek RC. Electrophoretic identification and genetic analysis of bivalve larvae. *Mar Biol* 1992;**113**:227-230.
21. Coffroth MA, Mulawka III JM. Identification of marine invertebrate larvae by means of PCR-RAPD species-specific markers. *Limnol Oceanogr* 1995;**40**:181-189.
22. Medeiros-Bergen DE, Olson RR, Conroy JA, Kocher TD. Distribution of holoturian larvae determined with specie-specific genetic probes. *Limnol Oceanogr* 1995;**40**:1225-1235.
23. Toro JE. Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based nuclear markers: the potential use in studies involving planktonic surveys. *J Shellfish Res* 1998;**17**:1203-1205.
24. André C, Lindergarth M, Jonsson PR, Sundberg P. Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD): differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki*. *J Mar Biolog Assoc UK* 1999;**79**:563-565.
25. Hare MP, Palumbi SR, Butman CA. Single-step species identification of bivalve larvae using multiplex polymerase chain reaction. *Mar Biol* 2000;**137**:953-961.
26. Paugam A, Le Pennec M, Geneviève AF. Immunological recognition of marine bivalve larvae from plankton samples. *J Shellfish Res* 2000;**19**:325-331.
27. Paugam A, Le Pennec M, Marhic M, André-Fontaine G. Immunological in situ determination of *Pecten maximus* larvae and their temporal distribution. *J Mar Biolog Assoc UK* 2003;**83**:1083-1093.
28. Demers A, Lagadeuc Y, Dodson JJ, Lemieux R. Immunofluorescence identification of early life history stages of scallops (Pectinidae). *Mar Ecol Prog Ser* 1993;**97**:83-89.
29. Abalde S, Fuentes J, González-Fernández Á. Identification of *Mytilus galloprovincialis* larvae from the Galician Rias by mouse monoclonal antibodies. *Aquaculture* 2003;**219**:545-559.
30. Lorenzo-Abalde S, González-Fernández Á, de Miguel V, Fuentes J. Two monoclonal antibodies for the recognition of *Mytilus* spp. larvae: studies on cultured larvae and tests on plankton samples. *Aquaculture* 2005;**250**:736-747.
31. Yentsch CM, Mague FC, Horan PK. Immunochemical approaches to coastal, estuarine and oceanographic questions. En: Yentsch CM, Mague FC, Horan PK (eds). *Lecture Notes on Coast and Estuarine Studies*. Springer-Verlag; 1988; Vol. 25, p. 1-399.
32. Ward BB. Immunology in biological oceanography and marine ecology. *Oceanography* 1990;**3**:30-35.
33. Nagaski K, Uchida A, Ishida Y. A monoclonal antibody which recognize the cell surface of red tide alga *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1991;**57**:1211-1214.
34. Mendoza H, López-Rodas V, González-Gil S, Aguilera A, Costas E. The use of polyclonal antisera and blocking of antibodies in the identification of marine dinoflagellates: species-specific and clone-specific antisera against *Gymnodinium* and *Alexandrium*. *J Exp Mar Biol Ecol* 1995;**186**:103-115.
35. López-Rodas V, Costas E. Immunochemical characterization of morphospecies and strains of *Prorocentrum* (dinophyceae). *J Exp Mar Biol Ecol* 1999;**238**:293-308.
36. Xin Z, Yu Z, Wang T, Hui X, Gou W, Sun J, et al. Identification and quantification of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium* sp. with competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA). *Harmful Algae* 2005;**4**:297-307.
37. Barreiro A, Guisande C, Frangópoulos M, González-Fernández A, Muñoz S, Pérez D, et al. Feeding strategies of the copepod *Acartia clausi* on single and mixed diets of toxic and non-toxic strains of the dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Mar Ecol Prog Ser* 2006;**316**:115-125.
38. Anderson DM. Toxic algal blooms and red tides: A global perspective. En: Okaichi T, Anderson DM, Nemoto T (eds). *Red Tides: Biology, Environmental Sciences, and Toxicology*. New York: Elsevier; 1989; p. 11-16.
39. Reid PC, Robinson GA, Hunt HG. Spatial and temporal patterns of marine blooms in the northeastern Atlantic and North Sea from the continuous plankton recorder survey. *Rapp. P.V. Reun Cons Int Explor Mer* 1987;**187**:27-37.
40. Bates SS. Domoic-acid-producing diatoms: another genus added! *J Phycol* 2000;**36**:978-985.
41. Lundholm N, Moestrup O, Rytter-Hasle G, Hoef-Emden K. A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*/cuspidate complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*? *J Phycol* 2003;**39**:797-813.
42. Scholin CA, Gulland F, Doucette GJ, Benson M, Busman M, Chavez FP et al. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature* 2000;**403**:80-84.
43. Work TM, Barr B, Beale AM, Fritz L, Quilliam MA, Wright JLC. Epidemiology of domoic acid poisoning in brown pelicans (*Pelecanus occidentalis*) and Brandt's cormorants (*Phalacrocorax penicillatus*) in California. *J Zoo Wild Med* 1993;**24**:54-62.
44. Sierra-Beltran AP, Palafox-Urbe M, Grajales-Montiel J, Cruz-Villacorta A, Ochoa JL. Sea bird mortality at Cabo San Lucas, Mexico: Evidence that toxic diatom blooms are spreading. *Toxicon* 1997;**35**:447-453.
45. Teitelbaum JS, Zatorre RJ, Carpenter S, Gendron D, Evans AC, Gjerde A et al. Neurologic sequelae of domoic acid intoxication due to the ingestion of contaminated mussels. *N Engl J Med* 1990;**322**:1781-1787.
46. Yasumoto T, Fukui M, Sasaki K, Sugiyama K. Determination of marine toxins in foods. *J AOAC Int* 1995;**78**:574-582.
47. Kat M. Dinophysis acuminate blooms, the distinct cause of mussel poisoning. In: Anderson, DM, White, AW & Baden, DG (eds). *Toxic Dinoflagellates*. New York, Elsevier, 1985; p. 95-100.
48. Fernandez ML, Cembella AD. Part B Mammalian Bioassays. In: Hallegraf G.M. et al. (eds). *Manual on harmful marine microalgae*. Paris, UNESCO, 1995; vol 33, p.213-228.
49. Ruberu SR, Liu YG, Wong CT, Perera SK, Langlois GW, Doucette GJ, Powell CL. Receptor binding assay for paralytic shellfish

- poisoning toxins: optimization and interlaboratory comparison. *JAOAC Int* 2003;**86**:737-745.
50. Bates HA, Rappoport H. A chemical assay for saxitoxin. Improvements and modifications. *J Agric Food Chem* 1978;**26**: 252-254.
 51. Hungerford JM, Lee S, Hall S. En: Proceedings of the Fifth International Conference on toxic Marine Phytoplankton, Newport, USA, October-November. En: Van Egmond HP, Aune T, Lassus P, Speijers GJA, Waldoock M (eds). Paralytic and diarrhoeic shellfish poisons: occurrence in Europe, toxicity, analysis and regulation. *J Nat Toxins* 1993;**2**:41-83.
 52. Sullivan JJ. Methods of analysis for DSP and PSP toxins in shellfish: A review. *J Shellfish Res* 1988;**7**:587-595.
 53. Chu FS, Fan TSL. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for saxitoxin in shellfish. *JAOAC* 1985;**68**:13-16.
 54. Chu FS, Hsu KH, Huang X, Barrett R, Allison C. Screening of paralytic shellfish poisoning toxins in naturally occurring samples with three different competitive enzyme-linked immunosorbent assays. *J Agric Food Chem* 1996;**44**:4034-4047.
 55. Usleber E, Diethrich R, Bürk C, Shneidier E, Märtlbauer E. Immunoassay methods for paralytic shellfish poisoning toxins. *JAOAC Int* 2001;**84**:1649-1655.
 56. Smith DS, Kitts DD. Enzyme Immunoassay for the determination of Domoic acid in Mussel extract. *J Agric Food Chem* 1995;**43**:367-371.
 57. Smith PT. Effect of removing accumulated sediments on the bacteriology of ponds used to culture *Penaeus monodon*. *Asian Fish Sci* 1998;**10**:355-370.
 58. Munday BL, Nakai T. Nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *World J Microbiol Biotechnol* 1997;**13**: 365-481.
 59. Sithigorngul P, Rukpratanporn S, Longyant S, Chaivisuthangkura P, Sithigorngul W, Menasveta P. Monoclonal antibodies specific to yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Org* 2002;**49**:71-76.
 60. Soowannayan C, Flegel TW, Sithigorngul P, Slater J, Hyatt A, Cramerri S et al. Detection and differentiation of yellow head complex viruses using monoclonal antibodies. *Dis Aquat Org* 2003;**57**:193-200.
 61. Poulos BT, Kibler R, Bradley-Dunlop D, Mohny LL, Lightner DV. Production and use of antibodies for the detection of the Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 1999;**37**:99-106.
 62. Erickson H, Zarain-Herzberg SM, Lightner DV. Detection of Taura syndrome virus (TSV) strain differences using selected diagnostic methods: diagnostic implications in penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 2002;**52**:1-10.
 63. Hsu YL, Wang KH, Yang YH, Tung MC, Hu CH, Lo CF et al. Diagnosis of *Penaeus monodon*-type baculovirus by PCR and by ELISA of occlusion bodies. *Dis Aquat Org* 2000;**40**:93-99.
 64. Nadala ECB, Tappy LM, Loh PC. Yellow-head virus: a rhabdovirus-like pathogen of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 1997;**31**:141-146.
 65. Hameed ASS, Anilkumar M, Stephen Raj ML, Jayaraman K. Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. *Aquaculture* 1998;**160**:31-45.
 66. Zhang X, Xu L, Xu X. Detection of prawn white spot bacilliform virus by immunoassay with recombinant antigen. *J Virol Met* 2001;**92**:193-197.
 67. Shih HH, Wang CS, Tan LF, Chen SN. Characterization and application of monoclonal antibodies against white spot syndrome virus. *J Fish Dis* 2001;**24**:143-150.
 68. Poulos BT, Pantoja CR, Bradley-Dunlop D, Aguilar J, Lightner D.V. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 2001;**47**:13-23.
 69. Lui W, Wang YT, Tian DS, Yin ZC, Kwang J. Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelope protein (28 kDa). *Dis Aquat Org* 2002;**49**:11-8.
 70. Anil TM, Shankar KM, Mohan CV. Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. *Dis Aquat Org* 2002;**51**:67-5
 71. Chaivisuthangkura P, Phattanapajitkul P, Thammapalerdb N, Rukpratanporn S, Longyanta S, Sithigorngula W, Sithigorngula P. Production of Polyclonal Antibodies against Recombinant VP26 Structural Protein of White Spot Syndrome Virus (WSSV). *Science Asia* 2006;**32**:201-204.
 72. Tamplin ML, Martin AL, Ruple AD, Cook DW, Kaspar CW. Enzyme immunoassay for identification of *Vibrio vulnificus* in seawater, sediments and oysters. *Appl Environ Microbiol* 1991;**57**:1235-1240.
 73. Sithigorngul W, Rengpipat S, Tansirisittikul A, Rukpratanporn S, Longyant S, Chaivisuthangkura P, Sithigorngul P. Development of monoclonal antibodies for simple identification of *Vibrio alginolyticus*. *Lett Appl Microbiol* 2006;**43**:436.
 74. Bradley-Dunlop DJ, Pantoja C, Lightner DV. Development of monoclonal antibodies for detection of necrotizing hepatopancreatitis in penaeid shrimp. *Dis Aquat Org* 2004;**60**:233-240.
 75. Small HJ, Wilson SD, Neil M, Hagan P, Coombs GH. Detection of the parasitic dinoflagellate *Hematodinium* in the Norway lobster *Nephrops norvegicus* by ELISA. *Dis Aquat Org* 2002;**52**:175-177.
 76. Stentiford GD, Neil DM, Coombs GH. Development and application of an immunoassay diagnostic technique for studying *Hematodinium* infections in *Nephrops norvegicus* populations. *Dis Aquat Org* 2001;**46**:223-229.
 77. Stentiford GD, Green M, Bateman K, Small HJ, Neil DM, Feist SW. Pink Crab Disease (PCD) of the edible crab *Cancer pagurus* is caused by an infection by a *Hematodinium*-like parasitic dinoflagellate. *J Invertebr Pathol* 2002;**79**:179-191.
 78. Arzul I, Renault T, Thébault A, Gérard A. Detection of oyster herpesvirus DNA and proteins in asymptomatic *Crassostrea gigas* adults. *Virus Res* 2002;**84**:151-160.
 79. Brudeseth BE, Raynard RS, King JA, Evensen O. Sequential Pathology after Experimental Infection with Marine Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Isolates of Low and High Virulence in Turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Vet Pathol* 2005;**42**:9-18.
 80. Sitja-Bobadilla A, Redondo MJ, Macias MA, Ferreiro I, Riaza A, Álvarez-Pellitero P. Development of immunohistochemistry and enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of circulating antibodies against *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Shellfish Immunol* 2004;**17**:335-345.
 81. Thuvander A, Fossum C, Lorenzen N. Monoclonal antibodies to salmonid immunoglobulin: characterization and applicability in immunoassays. *Dev Comp Immunol* 1990;**14**:415-423.

82. Milston RH, Vella AT, Crippen TL, Fitzpatrick MS, Leong JA, Schreck CB. In vitro detection of functional humoral immunocompetence in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) using flow cytometry. *Fish Shellfish Immunol* 2003;**15**: 145-158.
83. Dyrnyda EA, Pipe RK, Ratcliffe NA. Sub-populations of haemocytes in the adult and developing marine mussel, *Mytilus edulis*, identified by use of monoclonal antibodies. *Cell Tissue Res* 1997;**289**:527-536.
84. Jing X, Wenbin Z. Characterisation of monoclonal antibodies to haemocyte types of scallop (*Chlamys farreri*). *Fish Shellfish Immunol* 2005;**19**:17-25.
85. Jing X, Wenbin Z. Comparison of antigenicity among haemocytes of seven bivalve species by monoclonal antibodies against haemocytes of scallop (*Chlamys farreri*). *Fish Shellfish Immunol* 2006;**20**:528-535.
86. Simes DC, Williamson MK, Schaff BJ, Gavaia PJ, Ingleton PM, Price PA, Cancela ML. Characterization of Osteocalcin (BGP) and Matrix Gla Protein (MGP) Fish Specific Antibodies: Validation for Immunodetection Studies in Lower Vertebrates. *Calcif Tissue Int* 2004;**74**:170-180.
87. Shigeno S, Yamamoto M. Organization of the nervous system in the pygmy cuttlefish, *Idiosepius paradoxus* Ortmann (Idiosepiidae, Cephalopoda). *J Morphol* 2002;**254**:65-80.
88. Shepard S, Hartmann J. Immunologic identification of billfish carcasses. *Mol Marine Biol Biotechnol* 1996;**5**:215-219.
89. Lopata AL, Luijck T, Fenemore B, Sweijid NA, Cook PA. Development of a Monoclonal Antibody Detection Assay for Species-Specific Identification of Abalone. *Mar Biotechnol* 2002;**4**:454-462.
90. An H, Klein PA, Kao KK, Marshall MR, Otwell WS, Wei CI. Development of monoclonal antibodies for rock shrimp identification using enzyme-linked immunosorbent assay. *J Agric Food Chem* 1990;**38**:2094-2100.
91. Huang TS, Marshall MR, Kao KJ, Otwell WS, Wei CI. Development of monoclonal antibodies for red snapper (*Lutjans campechanus*) identification using enzyme-linked immunosorbent assay. *J Agric Food Chem* 1995;**43**:2301-2307.
92. Carrera E, García T, González I, Sanz B, Hernández PE. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of smoked salmon (*Salmo salar*), trout (*Oncorhynchus mykiss*) and bream (*Brama raii*). *J Food Protection* 1996;**59**:521-524.
93. Ting JH, Kelly LS, Snell TW. Identification of sex, age and species-specific proteins on the surface of the harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Mar Biol* 2000;**137**:31-37.