

Nuestra Facultad

TESIS DOCTORALES

EFFECTOS CITOTÓXICOS DE FTALATOS: IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES DE ECOTOXICIDAD EN LARVAS ACUÁTICAS DE *CHIRONOMUS RIPARIUS* (DIPTERA)

La Asociación Química Americana, a través de su sección *Chemical Abstracts Service* (CAS), la mayor fuente de información sobre sustancias químicas del mundo, registra en la actualidad más de 80 millones de sustancias orgánicas e inorgánicas. El registro se actualiza diariamente y en los últimos dos años ha aumentado en más de 10 millones de sustancias, lo que proporciona una clara idea de la dificultad de conocer con exactitud las implicaciones para la salud y el medio ambiente que la exposición a tan elevadísima cantidad de sustancias puede conllevar.

Por poner un ejemplo, de los 5.7 millones de toneladas métricas de contaminantes que en el año 2006 se liberaron al medio ambiente o se eliminaron como residuos en Norteamérica, 1.8 millones se correspondieron con sustancias consideradas persistentes, bioacumulables o tóxicas, 970000 con sustancias carcinógenas o que se sospechaba que podían serlo y 857000 con sustancias que estaban consideradas como tóxicas para la reproducción o el desarrollo. Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó en 2011 de que en el mundo 4.9 millones de muertes (8.3% del total) y 86 millones de años de vida perdidos (DALYs, *Disability-Adjusted Life Years*) (5.7% del total) eran atribuibles a la exposición medioambiental y la gestión de sustancias químicas [1].

En Europa, la entrada en vigor el 1 de junio de 2007 del Reglamento REACH, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos

[2], viene proporcionando un mayor control sobre aproximadamente 30000 sustancias de las 100106 que hasta esa fecha podían ser usadas sin conocer en profundidad sus propiedades, quedando a pesar de ello mucho camino por recorrer en materia de seguridad química.

Dentro de este mar de sustancias, el grupo de los ftalatos ha despertado un gran interés en los últimos años debido a su elevada producción, su carácter ubicuo y las diversas propiedades tóxicas de varios de sus miembros. Son compuestos oleosos, incoloros, inodoros y con usos muy variados (Figura 1), con aplicaciones en la industria, en medicina y en productos de consumo. Se emplean como plastificantes (más del 90% de los ftalatos producidos en la Unión Europea se destina a la fabricación de policloruro de vinilo), en dispositivos de uso médico (tubos y bolsas de sangre), cosméticos, envases alimentarios, calzado, cables eléctricos, embalajes, artículos de papelería, juguetes, CDs, pavimentos, etc. [3-6].

El di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) y el butil bencil ftalato (BBP) son dos de los cinco ftalatos que hasta la fecha han sido evaluados por la Agencia Europea de Sustancias Químicas, estando ambos incluidos en su lista de sustancias candidatas que suscitan especial preocupación por su capacidad disruptora endocrina. Su constante presencia en ambientes acuáticos resulta más preocupante debido a su capacidad de acumularse en los sedimentos y a lo largo de las cadenas tróficas.

Es precisamente la capacidad de este tipo de sustancias de alterar el sistema reproductor la que suscita mayor preocupación en el campo de la Toxicología ambiental. Con el nombre genérico de «disruptores endocrinos» (EDCs, *Endocrine Disrupting Chemicals*) se denomina a las sustancias químicas exógenas que alteran la función del sistema endocrino y, como consecuencia, causan efectos adversos para la salud en un organismo intacto, su prole, o en (sub)poblaciones. Estos



Figura 1: Ejemplos de materiales plásticos en cuyo proceso de fabricación se emplean ftalatos.



Figura 2: Distintos estados del desarrollo de *Chironomus riparius*. De izquierda a derecha, masa de huevos, larva de estadio IV y macho adulto (cortesía de Brian Valentine <http://www.flickr.com/photos/lordv/50440412/>).

compuestos pueden ejercer sus efectos mediante distintos mecanismos:

- Pueden mimetizar la actividad biológica de una hormona endógena, uniéndose a un receptor celular (efecto agonista).
- Pueden unirse a un receptor sin activarlo, impidiendo que lo hagan las hormonas naturales (efecto antagonista).
- Pueden alterar los niveles de hormonas presentes en el flujo sanguíneo, interfiriendo con las proteínas de transporte.
- Pueden interferir en los procesos metabólicos del organismo, afectando la síntesis o la lisis de las hormonas.
- Pueden modificar la actividad transcripcional de los genes relacionados con hormonas y receptores.

El número de sustancias químicas para las cuales se determina una actividad disruptora endocrina se incrementa día a día, representando una seria amenaza para la salud humana, la fauna y los ecosistemas. Entre todas ellas se pueden encontrar productos químicos sintéticos (biocidas, fitosanitarios, cosméticos, componentes de polímeros plásticos, pinturas, etc.), medicamentos sintéticos (anticonceptivos hormonales y terapia hormonal sustitutiva), productos químicos naturales (incluyendo toxinas como los fitoestrógenos) y hormonas naturales (procedentes de animales o personas y liberadas al medio ambiente, producidas por una especie y disruptoras endocrinas para otras). Además, según el último informe del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización Mundial de la Salud, acerca del estado de los conocimientos científicos sobre las sustancias químicas que perturbaban la función endocrina (*State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals*), muchas sustancias químicas sintéticas cuyos efectos sobre el sistema hormonal todavía están por investigar podrían tener importantes repercusiones en la salud [7].

La preocupación generada en torno a los EDCs radica en que el sistema endocrino, su principal diana, es crítico para el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, la diferenciación sexual y la regulación de los procesos metabólicos, de manera que su disfunción se manifiesta finalmente en anomalías en estos procesos.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar los efectos citotóxicos del DEHP y el BBP en larvas de cultivos de laboratorio y de poblaciones naturales de *Chironomus riparius*, organismo de referencia en Toxicología acuática. El estudio se ha orientado hacia la identificación de biomarcadores celulares y moleculares tempranos de toxicidad acuática que puedan ser utilizados en la evaluación del daño que estos compuestos ejercen sobre organismos invertebrados. Para ello, se han analizado los efectos tóxicos sobre procesos celulares fundamentales para la homeostasis y la supervivencia del organismo, como son la biogénesis de los ribosomas, la respuesta celular a estrés, la ruta endocrina y el metabolismo celular (energético y de detoxificación).

Los quironómidos son una familia de dípteros nematóceros ampliamente distribuida en todo el mundo, no existiendo prácticamente una masa de agua en la cual no puedan vivir sus larvas y representando frecuentemente el grupo de insectos más abundante y diversificado en medios acuáticos continentales. Constituyen un elemento clave en las cadenas tróficas de este tipo de ecosistemas [8], ya que resultan primordiales en la dieta de numerosas especies acuáticas y terrestres, en especial de peces y aves acuáticas [9].

Su ciclo vital comprende cuatro estados de duración desigual: huevo, larva, pupa e imago (Figura 2). Los tres primeros se desarrollan en todo tipo de medios acuáticos, incluyendo hábitats tan especializados como el agua axilar de plantas, troncos huecos (dendrotermata), fuentes termales, charcas intermareales, etc. [10]. El desarrollo de *Chironomus* tiene una duración variable, dependiendo fundamentalmente de la temperatura y la disponibilidad de alimento. En las condiciones de cultivo de

laboratorio, a una temperatura entre 18°C y 20°C, el ciclo vital de un individuo se completa en tres o cuatro semanas.

Las larvas de *Chironomus* han sido consideradas tradicionalmente un organismo modelo en estudios de contaminación natural o antropogénica, contando en la actualidad con cuatro ensayos estandarizados y aceptados internacionalmente con fines regulatorios [11,12,13,14]. En todos ellos se utilizan especies bien caracterizadas de quironómidos (*C. tentans*, *C. riparius*, *C. dilutus* o *C. yoshimatsui*), a cuyos individuos se les somete a exposiciones agudas y/o crónicas de compuestos químicos (desde 24 horas hasta dos generaciones), bien disueltos en agua, bien formando parte del sedimento en el que se desarrollan. Entre las posibles dianas de estudio se incluyen la inmovilización, el porcentaje de huevos que llegan a eclosionar, la mortalidad/supervivencia de las larvas, la concentración efectiva (EC_x, *Effective Concentration*), la menor concentración con efecto observado (LOEC, *Lowest Observed Effect Concentration*), la concentración sin efecto observado (NOEC, *No Observed Effect Concentration*), la duración del desarrollo, el peso, la reproducción, la fertilidad de los adultos y el ratio entre machos y hembras.

Aunque han sido descritos en vertebrados efectos tóxicos para la reproducción y el desarrollo por parte de los dos ftalatos objeto de estudio en esta tesis, la información sobre los efectos que provocan en invertebrados es todavía limitada. El análisis de los efectos citotóxicos, evidenciados por las alteraciones en diferentes procesos celulares, ha permitido identificar biomarcadores moleculares de exposición a estos compuestos y aumentar así la información disponible en la actualidad sobre los mecanismos de acción de los mismos.

El estudio de los efectos de estos ftalatos se llevó a cabo en tratamientos agudos en exposiciones cortas (24h), prolongadas (hasta 96h) y retardadas (24h de tratamiento y 24h de recuperación sin droga), mediante el análisis de cambios en la expresión de genes y en los niveles de actividad enzimática de dianas relacionadas con importantes procesos fisiológicos: biogénesis ribosómica (*ITS2*, *rpl4*, *rpl11* y *rpl13*), sistema endocrino (*EcR*, *ERR*), respuesta celular de estrés (*hsp70*, *hsc70*, *hsp40*, *hsp27* y *hsp10*), metabolismo energético (*GAPDH*) y metabolismo de xenobióticos (*CYP450*, *GST* y *GPx*).

Los resultados tras 24 horas de exposición a las dosis más altas de estos compuestos mostraron que tanto el BBP como el DEHP inducen la expresión del gen *hsp70*, lo que refuerza la idea de que éste constituye un buen biomarcador de estrés en invertebrados en multitud de situaciones ambientales adversas. Además, el BBP aumenta de forma significativa los niveles de transcrito del gen del receptor de la ecdisona (*EcR*), resultado que muestra por vez primera la capacidad del BBP de alterar

de forma selectiva un gen que representa un elemento clave en la ruta de señalización celular mediada por ecdisona, sugiriendo así una interacción directa con el sistema endocrino de los insectos. En contraposición, el DEHP también provoca una alteración en la actividad del gen *EcR*, aunque consistente en este caso en una represión. Este trabajo añade un nuevo dato que refuerza la idea del gen *EcR* como un biomarcador de disrupción endocrina valioso. Por último, el BBP causa una reducción significativa de los niveles de ARNr y de diversos genes codificantes para proteínas ribosómicas, resultado que proporciona la primera evidencia de la interacción del BBP con la biogénesis ribosómica y la alteración de la actividad del nucléolo, un orgánulo esencial para la supervivencia de las células. Sin embargo, el DEHP no altera significativamente ninguno de los elementos de la función nucleolar analizados.

Respecto a los estudios a tiempos largos de exposición, se observó un descenso en los niveles de expresión de la mayoría de los genes analizados, lo que podría ser en parte consecuencia de un efecto tóxico más general de los ftalatos. Sin embargo, hay un efecto genómico diferencial del DEHP y del BBP sobre genes específicos.

Los resultados más llamativos fueron los relacionados los estudios sobre la toxicidad retardada de estos compuestos, en los que se constató el aumento generalizado de los niveles de expresión génica, especialmente de los genes relacionados con la respuesta celular a estrés. Esta respuesta sólo se vio alterada en el caso de la ruta hormonal, donde el DEHP inhibe la expresión del gen *EcR* y se comporta de forma antagónica al BBP. Este estudio aporta resultados novedosos sobre los efectos diferenciales del DEHP y el BBP en *C. riparius* y ponen de manifiesto la importancia de este organismo en la evaluación del riesgo ecológico, especialmente en ecosistemas acuáticos.

A pesar de que los biomarcadores constituyen una herramienta importante en los ensayos de laboratorio, permitiendo vincular la exposición o el efecto de sustancias tóxicas con eventos clave celulares y moleculares, resulta necesaria su validación posterior en poblaciones naturales expuestas a una mezcla compleja de contaminantes antes de poder sacar conclusiones acerca de su utilidad en escenarios reales. En este trabajo se han analizado por primera vez los efectos tóxicos de ambos ftalatos en poblaciones naturales de larvas de *Chironomus riparius*, procedentes de un río contaminado de Galicia (Sar), las cuales se encuentran expuestas de manera habitual a multitud de xenobióticos, teniendo de este modo sus sistemas metabólicos adaptados a las condiciones físico-químicas del nicho ecológico que habitan.

Los resultados obtenidos en la evaluación de los efectos que los ftalatos provocan en larvas de campo muestran dife-

rencias importantes respecto a los datos obtenidos en larvas de laboratorio en cuanto al grado de toxicidad de ambos compuestos y en el efecto que provocan sobre algunas dianas, lo que confirma la necesidad de llevar a cabo este tipo de estudios para tener una aproximación más completa sobre las dianas de efecto que cada compuesto es capaz de alterar, así como al tipo de respuesta que pueden provocar en escenarios reales.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] UNEP. *Global Chemicals Outlook: Towards Sound Management of Chemicals*. United Nations Environment Programme, Nairobi, 2012.
- [2] Reglamento nº 1907/2006 (CE) del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan los Reglamentos nº 793/93 (CEE) del Consejo y el nº 1488/94 (CE) de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión. Diario Oficial de la Unión Europea, 29 de mayo de 2007, L136, Luxembourg.
- [3] Staples, C., Peterson, D., Parkerton, T. & Adams, W.J.: *The Environmental Fate of Phthalate Esters: A Literature Review*. Chemosphere, 35, 667-749 (1997).
- [4] Horn, O., Nalli, S., Cooper, D. & Nicell, J.: *Plasticizer metabolites in the environment*. Water Res., 38, 3693-8 (2004); doi:10.1016/j.watres.2004.06.012.
- [5] Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O. et al.: *A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 364, 2047-62 (2009); doi:10.1098/rstb.2008.0242.
- [6] Andrady, A.L. & Neal, M.A.: *Applications and societal benefits of plastics*. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., 364, 1977-84 (2009); doi:10.1098/rstb.2008.0304.
- [7] WHO. *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012*. World Health Organization, Geneva, 2013.
- [8] Berg, M.B. & Hellenthal, R.A.: *Life Histories and Growth of Lotic Chironomids (Diptera: Chironomidae)*. Ann. Entomol. Soc. Am., 85(5), 578-589 (1992).
- [9] Rieradevall, M. & García-Berthou, E.: *Chironomids in the diet of fish in Lake Banyoles (Catalonia, Spain)*. En Chironomids: from genes to ecosystems (P.S. Cranston ed.), 335-340. CSIRO Publications, 1995.
- [10] Cobo, F.: *Los Quironómidos (Diptera: Chironomidae) de los ríos Ulla y Sar. Estudio faunístico y ecológico*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, 1988.
- [11] OECD. *Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment*. Organization for Economic Co-operation and Development, París, 2004.
- [12] OECD. *Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water*. Organization for Economic Co-operation and Development, París, 2004.
- [13] OECD. *Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment*. Organization for Economic Co-operation and Development, París, 2010.
- [14] OECD. *Test No. 235: Chironomus sp., Acute Immobilisation Test*. Organization for Economic Co-operation and Development, París, 2011.

Óscar Herrero Felipe

Grupo de Biología y Toxicología Ambiental
Departamento de Física Matemática y de Fluidos