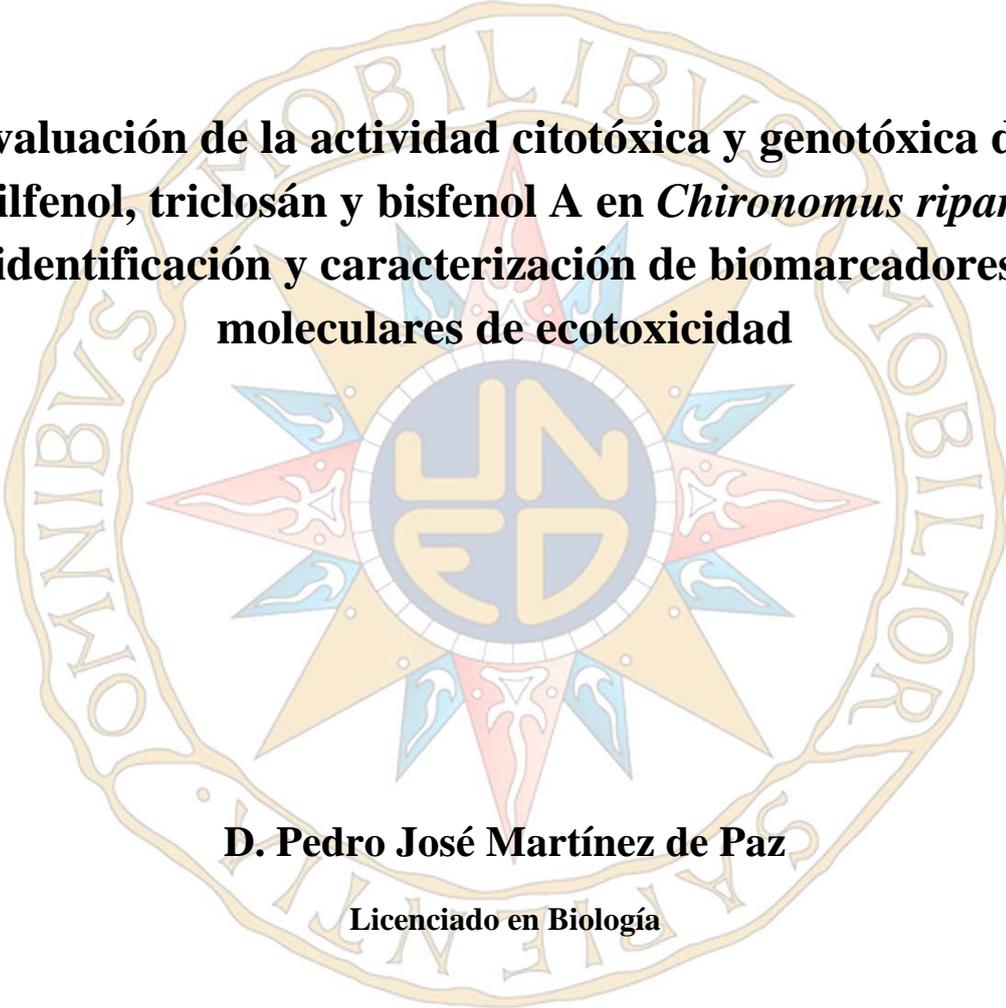


TESIS DOCTORAL**2014**The background features a large, faint watermark of the UNED seal. The seal is circular with a central emblem containing the letters 'UNED' in a stylized font. The emblem is surrounded by a sunburst pattern with rays in blue, red, and yellow. The outer ring of the seal contains the Latin motto 'OMNIBUS MOBILIBUS MOBILIOR' in gold capital letters.

**Evaluación de la actividad citotóxica y genotóxica del
nonilfenol, triclosán y bisfenol A en *Chironomus riparius*:
identificación y caracterización de biomarcadores
moleculares de ecotoxicidad**

D. Pedro José Martínez de Paz**Licenciado en Biología****Programa de Doctorado en Ciencias****Mónica Morales Camarzana****José Luis Martínez Guitarte**

TESIS DOCTORAL

2014

**Evaluación de la actividad citotóxica y genotóxica del
nonilfenol, triclosán y bisfenol A en *Chironomus riparius*:
identificación y caracterización de biomarcadores
moleculares de ecotoxicidad**

D. Pedro José Martínez de Paz

Licenciado en Biología

Programa de Doctorado en Ciencias

Directora: Mónica Morales Camarzana

Codirector: José Luis Martínez Guitarte

AGRADECIMIENTOS

Todo llega... Después de mucho tiempo culmina esta larga aventura en la que, de una manera u otra, han estado implicadas muchas personas. Es por ello que en esta primera página quiero darles las gracias por toda su ayuda en la realización de este trabajo.

Quiero agradecer en primer lugar a mis directores de tesis, la Dra. Mónica Morales y el Dr. José Luis Martínez, sin los que su ayuda este trabajo no habría podido llegar a su fin. Gracias a José Luis (Tatu) por haber aceptado la codirección de esta tesis, por sus comentarios y correcciones críticas. Y muy especialmente gracias Mónica, me has demostrado en todo este tiempo que has sido más que una directora de tesis y una compañera de laboratorio. Tu apoyo y tus ánimos me han dado las fuerzas para poder culminar este trabajo. Gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos. Este es el resultado de nuestro esfuerzo de todos estos años. Infinitas gracias, amiga.

También quiero dar las gracias a mis compañeros del Grupo de Biología de la UNED. Gracias a Gloria, María Jesús, Estrella, Pachi, Raquel, Charo, Chicho, Fernando, Óscar, Irene y Mónica Aquilino. Muchas gracias Gloria por darme la oportunidad y haber confiado en mí, aun sin conocerme, para formar parte de nuestro Grupo. A Raquel, gracias por toda tu ayuda y por haberme demostrado que puedo contar contigo en todo momento. Gracias a todos los compañeros "físicos" del Departamento de Física Matemática y de Fluidos, en especial al Dr. Carlos Antoranz, por su apoyo e interés en esta tesis. También quiero dar las gracias a la Dra. Mercedes de la Fuente por su ayuda y paciencia en mis mil y una dudas sobre la resolución de la estructura de proteínas.

Gracias a toda mi familia, especialmente a mis tías y tíos. A Gloria, Angelines, Elisa, Jesús, Feli, Carmen, Loli, Teo, Sebi y Lorenzo. Por haber estado siempre ahí, preocupándoos por mí, porque a la pregunta de ¿cómo va la tesis? ¿cuándo la presentas?, puedo responder AHORA. Gracias por todo el cariño que me habéis dado. Muchas gracias a Mario por todo el tiempo de distracción que hemos pasado, rutas en bicicleta, vuelos de aviones y helicópteros...

A Mingo, Santi, Miguel "el de Córdoba" y a todos mis amigos del pueblo. Gracias por haberme hecho salir de la rutina y conseguir que desconectara con nuestras cenas, salidas, pinchos... Gracias por haber tenido tanta paciencia conmigo en este último tiempo con mis "no puedo" a todos los planes que me proponíais.

Por último, y lo más importante, a mis padres y hermanos. A mis padres por haberme dado todas sus fuerzas en concluir esta larga e importante etapa de mi vida. Sin vosotros no hubiera llegado a culminar esta gran aventura. Gracias por haberme enseñado que todo el esfuerzo tiene su recompensa. Esta es nuestra recompensa. Gracias a vosotros soy lo que soy. Y cómo no, a la pequeña Irene, que sin saberlo consigue sacarme una sonrisa y alegrarme solo con verla.

Gracias

He aquí mi secreto. Es muy simple:
No se ve bien sino con el corazón. Lo esencial es invisible a los ojos.

El Principito. Antoine de Saint-Exupéry.



A mis padres.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	5
1. Contaminación de los ecosistemas acuáticos	7
2. Desarrollo de ensayos toxicológicos	8
3. <i>Chironomus riparius</i> como organismo de referencia en toxicología acuática	10
4. Compuestos disruptores endocrinos	13
5. Compuestos xenobióticos derivados del fenol	15
5.1. Nonilfenol	16
5.2. Triclosán	17
5.3. Bisfenol A	18
6. Biomarcadores	20
6.1. Biomarcadores del sistema endocrino	21
6.2. Biomarcadores de la respuesta a estrés celular	24
6.3. Biomarcadores del sistema de detoxificación celular	26
6.4. Daño en el ADN	28
OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Materiales	37
1.1. Material biológico	37
1.2. Compuestos	37
1.3. Reactivos y enzimas	37
1.4. Soluciones	38
1.5. Oligonucleótidos	38
2. Métodos	40
2.1. Extracción de ácidos nucleicos	40
2.1.1. Extracción de ADN	40
2.1.2. Extracción de ARN	40
2.1.2.1. Tratamiento del ARN con ADNasa	40
2.2. Transcripción inversa	41
2.3. Amplificación de ADN por PCR convencional	41
2.3.1. Amplificación de fragmentos de ADN utilizando la enzima Taq ADN polimerasa	41
2.3.2. Amplificación de fragmentos de ADN utilizando la enzima <i>Expand long Template</i>	41
2.4. Electroforesis en geles de agarosa	42
2.5. Clonación de fragmentos de PCR en plásmidos	42
2.5.1. Extracción de ADN de geles de agarosa	42
2.5.2. Ligación	42
2.5.3. Transformación	42
2.5.4. Selección	43

2.5.5. Purificación del plásmido	43
2.6. Obtención de la secuencia del ARN mensajero de los genes <i>CYP4G</i> , <i>hsp27</i> y <i>EcR</i>	43
2.6.1. Amplificación del ADN complementario del gen <i>CYP4G</i>	43
2.6.2. Amplificación del ADN complementario del gen <i>EcR</i>	44
2.6.3. Amplificación del extremo 3' del ADN complementario	44
2.6.3.1. Amplificación del extremo 3' del gen <i>CYP4G</i>	44
2.6.3.2. Amplificación del extremo 3' del gen <i>hsp27</i>	45
2.6.3.3. Amplificación del extremo 3' del gen <i>EcR</i>	45
2.6.4. Amplificación del extremo 5' del ADN complementario	45
2.6.4.1. Amplificación del extremo 5' del gen <i>CYP4G</i>	45
2.6.4.2. Amplificación del extremo 5' del gen <i>hsp27</i>	46
2.6.4.3. Amplificación del extremo 5' del gen <i>EcR</i>	46
2.7. Obtención de la secuencia del ADN de los genes <i>CYP4G</i> , <i>hsp27</i> y <i>EcR</i>	46
2.7.1. Amplificación del ADN genómico del gen <i>CYP4G</i>	46
2.7.2. Amplificación del ADN genómico del gen <i>hsp27</i>	47
2.7.3. Amplificación del ADN genómico del gen <i>EcR</i>	47
2.8. Secuenciación	47
2.9. Bioinformática	47
2.9.1. Cálculo del peso molecular y del punto isoeléctrico de proteínas	47
2.9.2. Modelización de la estructura tridimensional de proteínas	48
2.9.2.1. Modelización por homología de la estructura tridimensional de proteínas	48
2.9.2.2. Modelización por reconocimiento de plegamiento de la estructura tridimensional de proteínas	49
2.10. Hibridación <i>in situ</i>	50
2.10.1. Síntesis de la sonda de ADN	50
2.10.2. Preparación de los cromosomas politénicos	50
2.10.3. Hibridación con la sonda	51
2.10.4. Detección de la sonda	51
2.11. Tratamientos experimentales	51
2.12. Análisis de la supervivencia	51
2.13. Diseño de oligonucleótidos para el análisis de expresión del ARN mensajero	52
2.14. Cálculo de las eficiencias de amplificación de los oligonucleótidos	53
2.15. Análisis de los niveles de expresión mediante RT-PCR	54
2.15.1. Amplificación	54
2.15.2. Cuantificación	54
2.16. Ensayo de la actividad enzimática de la glutatión S-transferasa	55
2.16.1. Extracción de proteínas	55
2.16.2. Cuantificación de proteínas	55
2.16.3. Evaluación de la actividad enzimática de la GST	55
2.17. Ensayo cometa	55
2.17.1. Preparaciones	56
2.17.2. Cuantificación de los cometas	56
2.18. Análisis de datos	57

RESULTADOS	59
1. Caracterización de secuencias de genes y proteínas en <i>Chironomus riparius</i>	61
1.1. Caracterización molecular del gen <i>citocromo P450 (CYP4G)</i>	61
1.1.1. Identificación y secuenciación del gen <i>CYP4G</i>	61
1.1.2. Determinación de la estructura tridimensional de la proteína CYP4G	64
1.1.3. Localización cromosómica del gen <i>CYP4G</i>	66
1.2. Caracterización molecular del gen de la <i>proteína de choque térmico de 27 kDa (hsp27)</i>	67
1.2.1. Identificación y secuenciación del gen <i>hsp27</i>	67
1.2.2. Determinación de la estructura tridimensional de la proteína HSP27	69
1.2.3. Localización cromosómica del gen <i>hsp27</i>	70
1.3. Caracterización molecular del gen del <i>receptor hormonal de ecdisona (EcR)</i>	70
1.3.1. Identificación y secuenciación del gen <i>EcR</i>	70
1.3.2. Determinación de la estructura tridimensional de la proteína EcR	73
1.4. Identificación del gen <i>E74</i> de respuesta temprana a ecdisona	74
2. Evaluación de los efectos del nonilfenol, triclosán y bisfenol A sobre larvas de <i>Chironomus riparius</i>	74
2.1. Efectos del nonilfenol sobre larvas de <i>Chironomus riparius</i>	75
2.1.1. Análisis de la toxicidad del nonilfenol	75
2.1.2. Efectos del nonilfenol sobre la expresión de genes relacionados con el sistema endocrino	77
2.1.3. Efectos del nonilfenol en la respuesta a estrés celular	78
2.1.4. Efectos del nonilfenol sobre el sistema de detoxificación celular	79
2.1.5. Evaluación de la genotoxicidad del nonilfenol	80
2.2. Efectos del triclosán sobre larvas de <i>Chironomus riparius</i>	82
2.2.1. Análisis de la toxicidad del triclosán	83
2.2.2. Efectos del triclosán sobre la expresión de genes relacionados con el sistema endocrino	84
2.2.3. Efectos del triclosán en la respuesta a estrés celular	85
2.2.4. Efectos del triclosán sobre el sistema de detoxificación celular	86
2.2.5. Evaluación de la genotoxicidad del triclosán	87
2.3. Efectos del bisfenol A sobre larvas de <i>Chironomus riparius</i>	89
2.3.1. Análisis de la toxicidad del bisfenol A	89
2.3.2. Efectos del bisfenol A sobre la expresión de genes relacionados con el sistema endocrino	90
2.3.3. Efectos del bisfenol A en la respuesta a estrés celular	91
2.3.4. Efectos del bisfenol A sobre el sistema de detoxificación celular	92
2.3.5. Evaluación de la genotoxicidad del bisfenol A	93
DISCUSIÓN	95
1. Los genes <i>CYP4G</i> , <i>hsp27</i> y <i>EcR</i> de <i>Chironomus riparius</i>	97
2. Toxicidad del nonilfenol, triclosán y bisfenol A en <i>Chironomus riparius</i>	104
2.1. Efectos sobre el sistema endocrino	105
2.2. Efectos en la respuesta a estrés celular	109
2.3. Efectos sobre el sistema de detoxificación celular	112
2.4. Efectos genotóxicos	115
CONCLUSIONES	121

	<i>Página</i>
Figura 1	11
Figura 2	14
Figura 3	16
Figura 4	18
Figura 5	19
Figura 6	22
Figura 7	23
Figura 8	26
Figura 9	29
Figura 10	63
Figura 11	65
Figura 12	66
Figura 13	68
Figura 14	69
Figura 15	70
Figura 16	72
Figura 17	74
Figura 18	74
Figura 19	76
Figura 20	77
Figura 21	79
Figura 22	80
Figura 23	81
Figura 24	84
Figura 25	85
Figura 26	86
Figura 27	87
Figura 28	88
Figura 29	90
Figura 30	91
Figura 31	92
Figura 32	92
Figura 33	93
Figura 34	101

	<i>Página</i>
Tabla I	38
Tabla II	54
Tabla III	64
Tabla IV	65
Tabla V	66
Tabla VI	69
Tabla VII	73
Tabla VIII	76
Tabla IX	76
Tabla X	82
Tabla XI	84
Tabla XII	84
Tabla XIII	88
Tabla XIV	90
Tabla XV	90
Tabla XVI	94
Tabla XVII	100
Tabla XVIII	100
Tabla XIX	103
Tabla XX	110

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
Aa	Aminoácido
AAP	<i>Abridged Anchor Primer</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARE	<i>AU Rich Element</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASTM	<i>American Society for Testing Materials</i>
BCA	Ácido bicinconínico
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPA	Bisfenol A
C.A.S.	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CASP	<i>Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction</i>
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
CE	Consejo Europeo
CEPA	<i>Canadian Environmental Protection Act</i>
CISA	Centro de Investigación en Sanidad Animal
Ct	Ciclo umbral
Col	Colaboradores
CV	Coefficiente de Variación
CYP	<i>Citocromo P450</i>
DEB	<i>Dynamic Energy Budget Model</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIG	Digoxigenina
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EcR	Receptor de ecdisona
EcRE	Elemento de respuesta a ecdisona
EDC	<i>Endocrine Disrupting Chemicals</i> , compuesto disruptor endocrino
EDTA	Ácido etilén diaminotetraacético
EE.UU.	Estados Unidos
ER	Receptor de estrógenos
ERR	<i>Estrogen-Related Receptor</i>
FITC	Isocianato de fluoresceína
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GSH	Glutación
GST	Glutación S-transferasa
HSC	Proteína de choque térmico constitutiva
HSP	Proteína de choque térmico
ICBP	<i>Institut de Biologie et Chimie des Protéines</i>
IDEA	<i>Identification of Endocrine Disrupting Effects in Aquatic Organisms</i>
INIA	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria

Abreviaturas

IPTG	Isopropil-beta-tiogalactósido
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LC50	Concentración letal 50%
LT50	Tiempo letal 50%
Mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
Ng	Nanogramo
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NP	Nonilfenol
OCDE	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
P450	Proteína citocromo P450
Pb	Pares de bases
PDB	Base de Datos de Proteínas
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PolIA	Secuencia de poliadeninas
PPAR	Receptor activado por los proliferadores de peroxisomas
PSI-BLAST	<i>Position-Specific Iterated BLAST</i>
RACE	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i>
RNasin	Inhibidor de las enzimas ARNasas
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpL13	Proteína ribosómica L13
Rpm	Revoluciones por minuto
RMSD	Desviación cuadrática media
RT	Retrotranscripción
SCGE	<i>Single Cell Gel Electrophoresis</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
S.O.C.	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
sHSP	Proteína de choque térmico de pequeño tamaño
SIB	<i>Swiss Institute of Bioinformatics</i>
SMTL	<i>Swiss-Model Template library</i>
SOD	Superóxido dismutasa
SPSS	<i>Statistical Product and Service Solutions</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCS	Triclosán
TRITC	Isocianato de rodamina
UNED	Universidad Nacional de Educación a Distancia
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
USP	Ultraespiráculo
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

El desarrollo de la actividad industrial ha conducido a un aumento de la presencia de diferentes compuestos contaminantes de origen antropogénico en el medio ambiente. Como consecuencia, los seres vivos se encuentran expuestos a los mismos, desconociéndose los efectos que pueden tener sobre ellos.

En este sentido, el objetivo del presente trabajo de investigación ha sido conocer los efectos de los compuestos tóxicos nonilfenol (NP), triclosán (TCS) y bisfenol A (BPA) sobre larvas acuáticas del mosquito *Chironomus riparius*, un díptero empleado como organismo de referencia en los ensayos de toxicidad acuática, con la finalidad de identificar nuevos marcadores moleculares, bioquímicos y celulares de exposición a estos compuestos.

La primera parte de este trabajo se centra en la caracterización molecular de tres genes seleccionados como posibles biomarcadores en los estudios de respuesta a los compuestos NP, TCS y BPA, ampliando así la información genómica disponible de *C. riparius*. Estos genes son el gen *citocromo P450 (CYP4G)*, implicado en el sistema de detoxificación, el gen de la *proteína de choque térmico de 27 kDa (hsp27)*, incluido en la respuesta a estrés celular, y el gen *receptor de ecdisona (EcR)*, perteneciente a la ruta hormonal de la ecdisona.

El estudio de los efectos de los compuestos seleccionados se ha llevado a cabo mediante exposiciones a diferentes tiempos y a concentraciones subletales, analizándose los cambios de expresión de diferentes genes y de una actividad enzimática seleccionados como posibles biomarcadores de diferentes procesos celulares:

- Ruta de respuesta a la ecdisona: seleccionada por su importancia en el proceso endocrino mediado por esta hormona, implicada en el desarrollo y muda de los insectos. Se analizaron los niveles de expresión de los genes *EcR*, *usp* y *E74*. Por otro lado se estudiaron los efectos de los tres xenobióticos sobre la expresión del gen *ERR*.
- Respuesta a estrés celular: por su relevancia en la respuesta de los organismos para la adaptación frente a cambios ambientales a los que pueden verse sometidos, entre los que se encuentran la presencia de compuestos xenobióticos. Los genes estudiados como posibles biomarcadores de este proceso fueron los genes *hsp70* y *hsp27*.
- Sistema de detoxificación celular: por su implicación en la eliminación de compuestos extraños al organismo. Se seleccionaron el gen *CYP4G* y la actividad enzimática de la glutatión S-transferasa (GST) para su estudio como potenciales dianas de acción del NP, TCS y BPA.

Los resultados presentados en este trabajo han demostrado que los tres compuestos xenobióticos han sido capaces de alterar la expresión de los genes implicados en la ruta de respuesta a la ecdisona, actuando como antagonista en el caso del NP y como agonista en el caso del TCS y BPA, sugiriendo así una interacción directa de estos compuestos con el sistema endocrino de los insectos. Por otro lado, el análisis de los niveles de expresión de los genes *hsp70* y *hsp27* han demostrado una respuesta diferente de ambos genes en función del xenobiótico, pudiendo ser considerados como biomarcadores de estrés celular en invertebrados. Finalmente los resultados obtenidos en el estudio del sistema de detoxificación indican que existe una modulación diferente dependiendo del compuesto estudiado, mientras que el NP y el BPA inhibieron tanto la expresión del gen *CYP4G* como la actividad enzimática de la GST, el TCS no alteró ninguno de los dos parámetros estudiados, existiendo en los tres casos una correlación entre los efectos observados en la expresión del gen *CYP4G* con la actividad de la GST, lo que ha permitido analizar el sistema de detoxificación celular en su conjunto.

Además, se evaluó el potencial genotóxico de cada compuesto por medio del ensayo cometa o electroforesis en gel de una única célula (SCGE, *Single Cell Gel Electrophoresis*), método empleado para la detección de bajos niveles de daño en el ADN y que permite su valoración de forma tanto cualitativa como cuantitativa en cualquier célula eucariota. Los resultados presentados demuestran la capacidad genotóxica de los tres compuestos a todas las concentraciones y tiempos estudiados, siendo especialmente relevante la disminución del daño en el ADN en exposiciones de 96 horas respecto a los tratamientos de 24 horas. Esto puede explicarse por la activación de los mecanismos de reparación del ADN y/o los mecanismos de detoxificación celular en tiempos largos de exposición.

INTRODUCCIÓN

1. CONTAMINACIÓN DE LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS

En la actualidad, la producción, el consumo y la eliminación de compuestos químicos y desechos antropogénicos sigue aumentando como consecuencia del crecimiento de la población humana y del desarrollo industrial y económico, siendo el medio acuático el principal receptor de la contaminación generada. Entre las distintas sustancias contaminantes destacan los productos orgánicos sintéticos, derivados de la industria y la agricultura, los elementos radiactivos, el petróleo y sus derivados, los metales pesados y los desechos sólidos.

La calidad de vida humana está relacionada directa o indirectamente con la salud del medio ambiente que nos rodea, constituido por componentes abióticos y bióticos, que incluyen el aire, el agua, el suelo, las plantas y los animales, y en el que la vida se mantiene a través de complejas interacciones entre ellos. El deterioro de cualquiera de sus componentes puede tener un serio efecto colateral en la continuidad de la vida. El agua, esencial para la vida, se encuentra disponible de forma limitada y se ve sometida a una presión constante por la presencia de agentes infecciosos o productos químicos tóxicos que afectan a su calidad. El aumento de la demanda de agua potable así como la preocupación por la presencia en los ecosistemas acuáticos de compuestos contaminantes de origen antropogénico han dado lugar al desarrollo de diferentes normativas en todo el mundo para proteger este recurso.

Una vez los contaminantes se introducen en los ecosistemas acuáticos, se integran en un ciclo que implica el agua, los sedimentos y los organismos, sobre los que pueden tener un efecto tóxico directo y/o bioacumularse a través de la cadena trófica. Además, cuando los contaminantes se adsorben a los sedimentos aumentan su persistencia, haciendo que permanezcan disponibles durante más tiempo en los ecosistemas acuáticos. Los productos químicos orgánicos asociados con los sedimentos frecuentemente ingresan en la cadena alimentaria a través de los organismos bénticos, que constituyen el alimento para los organismos superiores. En último término se acumulan en predadores superiores, incluido el hombre, por lo que es importante analizar su toxicidad en organismos de las escalas inferiores de las cadenas tróficas.

Con el fin de proteger las aguas continentales, las aguas de transición, las aguas costeras y las aguas subterráneas se creó la Directiva Marco del Agua, una norma del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea (Directiva 2000/60/CE). En ella se estableció el marco de actuación comunitario en el ámbito de la política de aguas en la Unión Europea, con los objetivos de prevenir y reducir la contaminación, promover el uso sostenible del agua, proteger el medio ambiente, mejorar la situación de los ecosistemas acuáticos y paliar las consecuencias de las inundaciones y de las sequías.

El objetivo final de esta directiva es alcanzar un “buen estado” ecológico y químico de todas las aguas comunitarias para el año 2015.

2. DESARROLLO DE ENSAYOS TOXICOLÓGICOS

Con el objetivo de garantizar la protección de la salud humana y del medio ambiente se aprobó el 18 de diciembre de 2006 la normativa REACH (Reglamento (CE) n.º 1907/2006), que entró en vigor el 1 de junio de 2007. La normativa REACH es el reglamento europeo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) y supuso una reforma del marco legislativo sobre sustancias y mezclas químicas en la Unión Europea. Con esta normativa se pretendía estandarizar los métodos de evaluación y registro de las sustancias químicas, siendo especialmente importante el proceso de evaluación de riesgo de los compuestos. De acuerdo con este reglamento, se deben caracterizar los efectos tóxicos de las sustancias que se produzcan o importen en la Unión Europea, estableciendo diferentes niveles de exigencia dependiendo de las cantidades producidas o importadas de cada compuesto o preparado químico.

La evaluación del riesgo de los productos químicos es un procedimiento para caracterizar los efectos tóxicos de una sustancia química, que sirve de base a las agencias reguladoras para la gestión del riesgo en relación con la exposición. La caracterización del riesgo es la estimación cuantitativa y/o cualitativa de los efectos nocivos asociados a los agentes químicos, incluyendo como etapa principal la evaluación de la toxicidad de los compuestos. En la actualidad, y a pesar de la existencia de múltiples abordajes experimentales, la mayoría de ensayos para evaluar la toxicidad de los productos químicos se llevan a cabo empleando animales de laboratorio.

La aplicación de la normativa REACH implica un gran aumento de los ensayos de toxicidad de los compuestos químicos, lo que conlleva un incremento del número de pruebas realizadas en animales. Para evitar este posible aumento, esta normativa promueve métodos alternativos, especificando en el anexo VI que los ensayos con animales vertebrados se realizarán como último recurso. Por otro lado, el 30 de mayo de 2008 se aprobó el Reglamento (CE) n.º 440/2008, modificado por el Reglamento (UE) n.º 260/2014, en el que se establecen los métodos de ensayo de acuerdo con la normativa REACH, desarrollando los métodos de sustitución, reducción y perfeccionamiento de la experimentación con animales.

Los métodos alternativos son aquellos procedimientos que pueden reemplazar completamente la necesidad de la experimentación con animales, reducir el número de individuos requeridos o disminuir el estrés que sufren durante la experimentación. Estos métodos conllevan la aplicación del principio de las 3Rs (reemplazar, reducir y refinar), promulgado por primera vez por Russell y Burch en 1959, el cual implica reemplazar los animales de experimentación por otros métodos, siempre que sea posible y proporcione la misma información, reducir cuando sea posible el número de animales empleados en la experimentación y refinar las técnicas empleadas con los animales. Entre los métodos alternativos destacan la aproximación por analogía (*read-across*), los métodos *in silico* (relaciones cuantitativas estructura-actividad o QSAR, toxicocinética, toxicodinámica y modelización de procesos bioquímicos, fisiológicos, farmacológicos, toxicológicos y de sistemas de comportamiento), la genómica, la proteómica y la metabolómica, el uso de vertebrados en estadios tempranos de desarrollo o de organismos con menor sensibilidad y/o no protegidos por la legislación (invertebrados, plantas y microorganismos) y, por último, los métodos *in vitro* (fracciones subcelulares, láminas de tejidos, órganos perfundidos, explantes, reagregados celulares, micromasas, cultivos primarios, líneas celulares y cultivos organotípicos en tres dimensiones).

Actualmente son frecuentes los estudios de ecotoxicidad acuática para conocer los efectos que presentan los distintos compuestos con potencial contaminante o que se han descrito como tales. En general, en los estudios de ecotoxicología acuática se emplean diferentes organismos pertenecientes a tres grupos taxonómicos: algas, invertebrados acuáticos y peces. Entre los invertebrados empleados en los ensayos de toxicidad acuática destacan las especies *Hyaella azteca* (Crustacea, Amphipoda), *Lumbriculus variegatus* (Annelida, Oligochaeta), *Chironomus tentans* y *Chironomus riparius* (Insecta, Diptera), los cuales han ido adquiriendo un creciente interés en los ensayos de toxicidad (USEPA, 2000). Estas especies se caracterizan por su corto ciclo de vida y porque requieren de poco espacio y equipamiento en el laboratorio para su cultivo; además tienen una amplia distribución geográfica y se encuentran en la base de las cadenas tróficas, por lo que una alteración en su base puede tener consecuencias graves en especies de interés ecológico y económico.

Dada la gran cantidad y variedad de contaminantes de origen antropogénico, el desarrollo de métodos alternativos a la experimentación con animales se está convirtiendo en un verdadero desafío y la aplicación de pruebas toxicogenómicas está ganando aceptación como una metodología rápida y eficiente (Snell y col., 2003). La caracterización de cómo los genomas responden frente a la presencia de compuestos tóxicos o a diferentes tipos de estrés ambiental ha llevado al desarrollo de la toxicogenómica, que se define como la aplicación de diferentes tecnologías genómicas para el estudio de los efectos adversos de los compuestos tóxicos sobre la salud humana y del

medioambiente. La toxicogenómica combina la toxicología con la información genómica para integrar las alteraciones específicas de los compuestos tóxicos sobre los patrones de expresión de genes, las proteínas y otros metabolitos con las respuestas fenotípicas de células, tejidos y organismos. Su objetivo es determinar cómo la regulación y la expresión de los genes controlan las respuestas fisiológicas inducidas por la exposición a un compuesto tóxico (Neumann y Galvez, 2002), lo que podría proporcionar información más discriminatoria, predictiva y sensible que los métodos actuales de evaluación de las exposiciones a compuestos tóxicos y predecir sus efectos sobre la salud humana (National Research Council (US), 2007). Así, el desarrollo de la metodología para la identificación y evaluación de los cambios de expresión de un conjunto de genes por la presencia de compuestos tóxicos permite conocer el mecanismo de acción de dichos compuestos y las rutas metabólicas implicadas en la respuesta toxicológica.

A pesar del limitado alcance de la información proveniente de los ensayos de toxicidad para su extrapolación a escala ambiental, los estudios con organismos en laboratorio, en condiciones controladas y estandarizadas para la evaluación de respuestas, han sido la fuente de información predominante para la evaluación de los efectos tóxicos de los contaminantes. En este trabajo de investigación se aborda el estudio del efecto de diferentes compuestos xenobióticos empleando como modelo experimental larvas de cuarto estadio de *Chironomus riparius* mediante la aplicación de diferentes metodologías moleculares, bioquímicas y celulares, entre las que se encuentran el análisis de la expresión de genes de diferentes rutas metabólicas y el estudio de una actividad enzimática, así como el daño en el ADN producido por la exposición a estos compuestos.

3. *Chironomus riparius* COMO ORGANISMO DE REFERENCIA EN TOXICOLOGÍA ACUÁTICA

Los quironómidos (Diptera, Chironomidae) son uno de los dípteros más abundantes en los sistemas acuáticos (Ramussen, 1985) y representan uno de los elementos clave en la cadena trófica de los ecosistemas acuáticos (Berg y Hellenthal, 1992). Constituyen un importante componente de la dieta de numerosas especies acuáticas y terrestres, principalmente en peces y aves acuáticas (Rieradevall y col., 1995). Las comunidades bentónicas, en las que los quironómidos constituyen uno de los macroinvertebrados más abundantes, son sensibles a los cambios en las condiciones del agua y de los sedimentos, siendo unos excelentes indicadores ambientales para valorar las alteraciones hidrológicas y el impacto de los contaminantes.

Estos dípteros se emplean en los estudios de ecotoxicidad acuática y como indicadores biológicos de la calidad del agua al ser considerados como organismo de referencia. Existen protocolos

estandarizados para el desarrollo de ensayos de toxicidad con estos insectos publicados por diferentes organismos, entre los que se encuentran la Agencia de Protección Medioambiental de los EE.UU. (USEPA, *United States Environmental Protection Agency*), la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE, *Organization for Economic Co-operation and Development*) o la Sociedad Americana para el Ensayo de Materiales (ASTM, *American Society for Testing Materials*) (USEPA, 1996, 2000; OCDE, 2004, 2011; ASTM, 2006), siendo las especies *Chironomus tentans* (Fabricius) y *Chironomus riparius* (Meigen) las especies más empleadas en los mismos, aunque en menor medida también se emplean otras especies de quironómidos, como son *C. prasinus*, *C. decorus* y *C. plumosus*. De entre ellas, *C. riparius* se ha seleccionado como especie modelo en el proyecto europeo IDEA para evaluar los efectos de compuestos con capacidad disruptora endocrina en invertebrados acuáticos (Segner y col., 2003).

El ciclo vital de este mosquito presenta las etapas de huevo, larva (con cuatro estadios), pupa y adulto, siendo todas acuáticas excepto la etapa de adulto (Figura 1). Las larvas viven principalmente asociadas a los sedimentos, en los que forman pequeños tubos construidos con algas, partículas de sedimentos y fibras de proteínas gigantes del tipo de la seda secretadas por sus glándulas salivales. Su ciclo de vida dura entre tres y cuatro semanas en condiciones de cultivo de laboratorio, siendo la temperatura y la disponibilidad de alimentos los factores que más influyen sobre él. Las larvas presentan tolerancia a un amplio rango tanto del pH como de los niveles de oxígeno, de la salinidad y del tamaño de los sedimentos (Anderson, 1977). Pueden vivir en aguas contaminadas por materia orgánica y llegan a alcanzar una alta densidad de población cuando las condiciones son muy favorables.



Figura 1. Ciclo de vida de *Chironomus riparius*. Las etapas de huevo, larva y pupa son acuáticas, mientras que la etapa de adulto es aérea.

Los quironómidos se han seleccionado como organismo modelo en los ensayos de toxicidad acuática por sus numerosas ventajas frente a otros organismos. La amplia tolerancia de las larvas a diversas condiciones, la facilidad del cruzamiento y de la recolección de las puestas hace que sea una especie idónea para su cultivo en laboratorio y, por tanto, para ensayos de toxicidad ambiental. Entre los diferentes ensayos de toxicidad con *C. riparius* se encuentran los ensayos de toxicidad aguda, que proporcionan información sobre la toxicidad del compuesto y además permiten llevar a cabo estudios comparativos, y los ensayos de toxicidad crónica, en los que se evalúan parámetros relacionados con el ciclo de vida, el crecimiento y la reproducción, como son la supervivencia en los distintos estadios, la duración de los mismos, el tamaño y peso de las larvas, el número, dimensión y eclosión de las puestas y la emergencia de adultos.

Otros estudios se han centrado en la inducción de malformaciones y asimetrías, principalmente en las piezas bucales, como consecuencia de la exposición a compuestos tóxicos, empleándose como un biomarcador sensible a metales pesados (de Bisthoven y col., 1998, 2001; Martínez y col., 2004), fenbendazol (Park y col., 2009), di(2-etilhexil) ftalato (Park y Kwak, 2008) y 17- α -etinilestradiol (Meregalli y Ollevier, 2001), aunque se ha descrito que la endogamia en los cultivos de quironómidos de laboratorio podría incrementar la tasa de deformidades en estas especies, por lo que este factor debe tenerse en cuenta cuando se emplea este organismo en estudios de toxicología (Vogt y col., 2013). Por otro lado se han descrito deformidades en las antenas de las larvas producidas por metales pesados (Bhattacharyay y col., 2005).

En cambio, apenas se han analizado parámetros a nivel molecular, bioquímico y celular en quironómidos. Actualmente, se dispone de una serie limitada de biomarcadores moleculares para el estudio de los diferentes tóxicos. Entre ellos se encuentran las hemoglobinas (Anderson y col., 2008; Ha y Choi, 2008a, 2008b), genes que codifican para proteínas de choque térmico (Park y Kwak, 2008; Yoshimi y col., 2009; Morales y col., 2011) y diferentes enzimas implicadas en la eliminación de especies reactivas del oxígeno (Datkhile y col., 2009; Nair y col., 2011a, 2013a; Park y col., 2012; Wiseman y col., 2013), así como el análisis de la actividad enzimática de la acetil colinesterasa (AChE) y de la glutatión S-transferasa (GST) (Fisher y col., 2000; Domingues y col., 2009; Nair y Choi, 2011; Pérez y col., 2013).

El sistema endocrino de los insectos es uno de los mejor descritos después del de los vertebrados, por lo que el empleo de larvas acuáticas de *C. riparius* ofrece la posibilidad de analizar la capacidad disruptora endocrina de los compuestos químicos al evaluar su toxicidad.

4. COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS

Los compuestos disruptores endocrinos (EDCs, *Endocrine Disrupting Chemicals*) se definen como aquellas sustancias exógenas que alteran la función o funciones del sistema endocrino, produciendo efectos sobre la salud de los organismos sanos, en su descendencia o en las poblaciones (IPCS, 2002). Los EDCs son capaces de alterar el sistema hormonal, mimetizando a una hormona o bloqueando su acción, lo que produce la estimulación o la inhibición anormal del sistema endocrino. Este sistema es crítico para el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, la diferenciación sexual y la regulación de los procesos metabólicos.

Los EDCs son compuestos generalmente de origen antropogénico que se encuentran en el medio ambiente y en multitud de productos, entre los que se encuentran pesticidas, aditivos, productos de cuidado personal y plásticos. La exposición de los seres humanos a los EDCs se produce a través de la ingestión de alimentos y agua, la inhalación de gases y partículas en el aire y a través de la piel. Las mujeres embarazadas y los niños son los más vulnerables a los efectos por la exposición a estos compuestos, cuyos desequilibrios pueden no hacerse evidentes hasta etapas posteriores de la vida.

La dispersión de este tipo de sustancias en el ambiente supone un problema a nivel mundial, siendo el medio acuático uno de los más sensibles a la contaminación (Kang y col., 2007). Además se produce un aumento continuo de sustancias catalogadas como disruptores endocrinos. Organismos internacionales como la OCDE, la USEPA y la OMS (Organización Mundial de la Salud) desarrollan programas de detección y sistemas de ensayos para evaluar los efectos de sustancias catalogadas como potenciales disruptores endocrinos con el fin de restringir su utilización y producción. Actualmente la lista publicada por la Comisión Europea incluye más de 500 sustancias con potencial capacidad de disrupción endocrina.

La importancia de conocer los efectos de los potenciales disruptores endocrinos ha llevado al desarrollo de numerosos estudios en distintas especies animales, permitiendo descubrir cada vez más moléculas con esta capacidad. La dificultad de predecir sus efectos a largo plazo hace que su estudio sea una de las prioridades más importantes para la investigación en el campo de la toxicología ambiental ya que representan una seria amenaza para la salud humana, la fauna y los ecosistemas.

Se han descrito efectos muy notables en invertebrados producidos por la exposición a EDCs, como son la inducción de imposex (desarrollo de órganos sexuales masculinos en individuos femeninos, produciendo su esterilidad), intersex (presentar características masculinas y femeninas simultáneamente), retrasos en el desarrollo, inhibición de la metamorfosis y la reducción de la

capacidad reproductiva. A pesar de que los invertebrados presentan una gran relevancia ecológica, constituyendo aproximadamente el 95 % de todas las especies animales y de ser esenciales en el mantenimiento de la biodiversidad, son muy escasos los estudios a nivel molecular, bioquímico y celular, por lo que se desconoce en gran parte el modo de acción de estos compuestos y su mecanismo de interacción con el sistema hormonal de estos organismos.

Los EDCs pueden alterar las respuestas endocrinas mediadas por diferentes hormonas, principalmente estrógenos, aunque también interfieren, entre otras, en las mediadas por andrógenos, hormona tiroidea, insulina y prolactina. Los EDCs pueden actuar en las células diana a través del receptor específico de hormonas esteroideas, perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares, los cuales actúan como factores de transcripción regulando una serie de genes que controlan los programas de desarrollo y las funciones fisiológicas mediadas por estas hormonas. Una manera de mimetizar la acción de la hormona natural es uniéndose al receptor nuclear y emulando su acción, pero también pueden bloquear su acción o incrementar o disminuir el efecto de ésta (Figura 2). Otra forma de actuación de los EDCs es a través de la alteración de los niveles hormonales en el organismo, interfiriendo en su metabolismo. Por último, pueden afectar a los niveles proteicos del receptor funcionalmente activo de la hormona. De esta forma, productos que se encuentran presentes en el medio ambiente pueden ejercer un efecto endocrino no deseado.

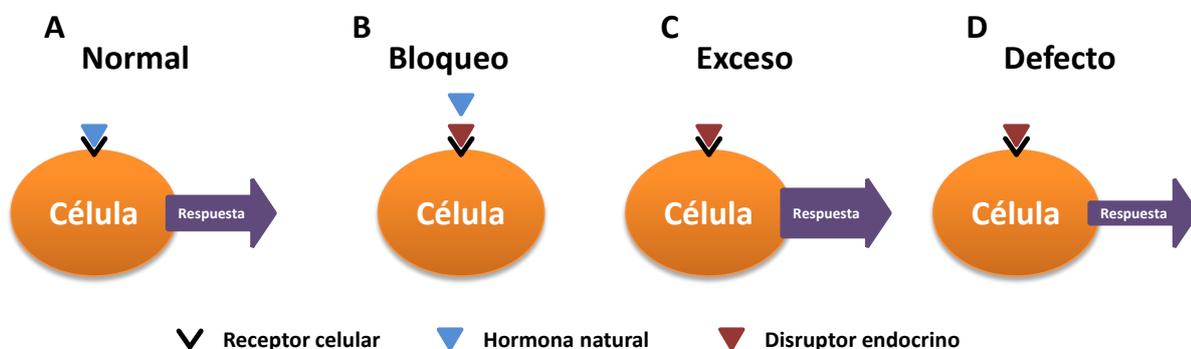


Figura 2. Modo de acción de un EDC. (A) Respuesta de la hormona natural. (B) Se produce el bloqueo del receptor por el EDC, impidiendo la unión de la hormona y la respuesta. (C) El EDC se une al receptor y produce una mayor respuesta que la que genera la hormona natural. (D) El EDC produce una menor respuesta que la hormona natural tras unirse al receptor.

A pesar de que el sistema hormonal de invertebrados es menos conocido que el de vertebrados, se han identificado receptores nucleares de hormonas esteroideas en estos organismos. Los receptores nucleares se encuentran evolutivamente conservados y constituyen una superfamilia génica muy diversa. Por tanto, los efectos observados en la fauna silvestre o en animales experimentales pueden producirse también en los seres humanos, haciendo especialmente importante conocer los

mecanismos de interacción para poder predecir los efectos en el desarrollo temprano, ya que a menudo son irreversibles y pueden no ser evidentes hasta etapas posteriores de la vida.

En el caso de los invertebrados se han descrito efectos muy notables provocados por la exposición a EDCs, pero todavía son muy escasos los estudios a nivel celular y subcelular y, en la práctica, se desconocen los mecanismos de acción de estos compuestos y su interacción con sus sistemas endocrinos. Por este motivo, la existencia de biomarcadores moleculares de acción o efecto de los EDCs es una herramienta valiosa para diseñar protocolos estandarizados de monitorización, ya que la disponibilidad de marcadores génicos permite la evaluación simultánea de múltiples genes, un gran número de muestras y la obtención de datos cuantitativos mediante tecnologías genómicas de forma rápida y eficiente (Sahu, 2008).

Uno de los objetivos prioritarios para la evaluación del impacto ambiental de los EDCs es la selección de protocolos adecuados para su ensayo en invertebrados (OCDE, 2006a). La elección de las especies de ensayo debe basarse en la relevancia ecológica del grupo de invertebrados al que pertenece, el conocimiento de sus sistemas endocrinos y sus hormonas y la existencia de test estandarizados y de amplio uso en el organismo seleccionado. En este sentido, *Chironomus riparius* constituye un buen candidato ya que es una especie relevante en ecotoxicología y, como insecto, su sistema endocrino es de los más ampliamente estudiados dentro de los invertebrados (Taenzler y col., 2007).

5. COMPUESTOS XENOBIÓTICOS DERIVADOS DEL FENOL

En los últimos años ha aumentado la preocupación, tanto por parte de la población como de los investigadores, por la acumulación de compuestos xenobióticos en el medio ambiente. Entre ellos se encuentran los compuestos fenólicos, que podrían modular el sistema neuronal y endocrino, produciendo efectos nocivos sobre el ser humano y la fauna silvestre.

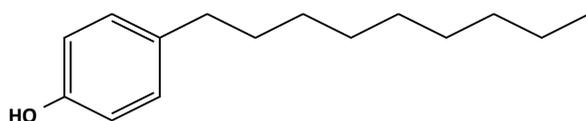
Se ha descrito la capacidad disruptora endocrina de algunos de estos compuestos, que actúan mimetizando los estrógenos al ser capaces de interactuar con el receptor de estrógenos humano (Nishihara y col., 2000), así como con otros genes relacionados con la respuesta a estrógenos (Terasaka y col., 2006). Algunos de ellos, como los fenoles clorados y los fenilfenoles, pueden interactuar con más de un receptor, por lo que podrían alterar diferentes funciones hormonales, haciendo difícil la interpretación de sus mecanismos de acción (Li y col., 2010). Comparada con los ligandos naturales, la capacidad de los fenoles de actuar como agonistas o antagonistas de hormonas es menor, pero su capacidad de actuar mediante diferentes mecanismos podría potenciar sus efectos

sobre el organismo, siendo la respuesta final determinada por la interacción de todas las rutas implicadas (Molina-Molina y col., 2006).

5.1. Nonilfenol

El nonilfenol (NP) es un compuesto que pertenece al grupo de los alquilfenoles. Su estructura química consta de un anillo aromático central de benceno con un grupo alcohol al que se une una cadena lateral de nueve átomos de carbono (Figura 3). La producción a nivel mundial de estos compuestos se estima en más de 200.000 toneladas al año (USEPA, 2010), siendo el 4-NP el más común, en el que la cadena lateral se une al anillo en el lado opuesto al carbono con el grupo hidroxilo (Cox, 1996). La principal aplicación del 4-NP es la producción de etoxilados empleados en la fabricación de detergentes de uso doméstico e industrial. Además se encuentra presente en pinturas, adhesivos, pesticidas y endurecedores de resinas epoxi y se emplea en la producción de papel y de productos cosméticos, así como en la industria textil. Por otro lado también se usa en diferentes productos de laboratorio, en los agentes de curtido, como antioxidante en plásticos, como aditivo en los aceites lubricantes y en productos de limpieza de las ubres de vacas lecheras.

Tanto el NP como sus derivados etoxilados están incluidos en la lista de sustancias peligrosas prioritarias de la Directiva Marco del Agua (Directiva 2000/60/CE), actualizada por la Directiva 2013/39/UE, y su uso está actualmente regulado en la Unión Europea (Directiva 2003/53/CE), aunque la producción y uso de los derivados de NP comenzaron a reducirse con la introducción voluntaria de diferentes acuerdos entre la industria y los gobiernos de los países de la Unión Europea (OSPAR Convention, 2000). El NP se acumula en los ambientes que tienen elevado contenido en materia orgánica, aguas residuales y en los sedimentos de los ríos, donde es un compuesto persistente. Se estima que presenta una vida media de más de sesenta años en los sedimentos (Shang y col., 1999).



Propiedades físico-químicas

Fórmula química	4-nonilfenol
Fórmula empírica	C ₁₅ H ₂₄ O
Nº C.A.S.	104-40-5
Peso molecular	220,35 gr/mol
Solubilidad en agua	7 mg/L a 25°C

Figura 3. Estructura molecular y propiedades físico-químicas del nonilfenol.

Se ha descrito que el NP es un agonista de los receptores de estrógeno compitiendo con el estradiol por el sitio de unión a ligando (Soto y col., 1991; Rajapakse y col., 2001), aunque es 100.000 veces

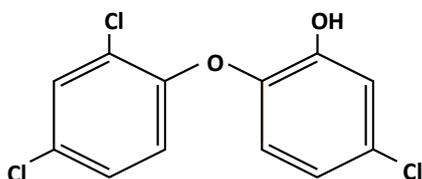
menos potente que el estradiol (CEPA 1999, 2001). Además se ha relacionado la infertilidad en los hombres con la exposición a NP (Ponzo y Silvia, 2013). Por otro lado se ha demostrado su actividad estrogénica al inducir y sobreexpresar el receptor de la progesterona en células tumorales de mama (Soto y col., 1991), su unión al ERR γ humano (Takayanagi y col., 2006) y su actividad antiandrogénica mediada por el receptor de andrógenos (Xu y col., 2005). Además, se ha estudiado el efecto del NP en organismos acuáticos, principalmente en peces, en los que se ha observado que es capaz de inducir la síntesis de proteínas características de las hembras, afectar a la morfología de los testículos y a la fertilidad en machos (Lavado y col., 2004).

Estudios previos han descrito la capacidad del NP de producir alteraciones en parámetros relacionados con la reproducción, el desarrollo y la emergencia de las larvas de *C. riparius* (Bettinetti y col., 2002; Bettinetti y Provini, 2002; Lee y Choi, 2006), lo que sugiere su acción como EDC. También se han descrito cambios producidos por este compuesto en parámetros implicados en la detoxificación, en el desarrollo celular, en los niveles de sus hemoglobinas, en su sistema endocrino y en la respuesta a estrés celular (Ha y Choi, 2008a, 2008b; Park y Kwak, 2010, 2012; Morales y col., 2011; Nair y col., 2011a, 2013b, 2013c; Nair y Choi, 2012). Por último se ha descrito que produce alteraciones morfológicas como deformidades en las piezas bucales, lo que puede interpretarse como un efecto teratogénico de este xenobiótico en *C. riparius* (Meregalli y col., 2001; Arambourou y col., 2012).

5.2. Triclosán

El triclosán (TCS) es un compuesto aromático clorado (Figura 4) empleado como antibacteriano de amplio espectro en productos de cuidado personal, como son jabones, dentífricos, enjuagues bucales y desodorantes. Además, actualmente hay un aumento del número de productos que contienen triclosán, entre los que se encuentran alfombras, bolsas de basura, juguetes para bebés y vajillas desechables. Los productos de cuidado personal que contienen triclosán son frecuentemente eliminados por los desagües, llegando a las plantas de tratamiento de aguas residuales, en las que aproximadamente el 30 % del TCS es adsorbido por los lodos (Bester, 2003), los cuales suelen ser empleados como abono en la agricultura. Por lo tanto, las dos vías más importantes de contaminación del medio ambiente con TCS son a través de las descargas de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales y del empleo de los lodos contaminados con TCS en la agricultura. Se estima que el TCS presenta una vida media en aguas superficiales de once años (Bester, 2005). Como consecuencia de su amplio uso como agente antimicrobiano, el TCS ha llegado a ser un compuesto de distribución ubicua en los ecosistemas, además de haberse detectado en

orina, plasma y leche materna (Adolfsson-Erici y col., 2002; Allmyr y col., 2006, 2008; Wolff y col., 2007; Calafat y col., 2008).



Propiedades físico-químicas

Fórmula química	5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxy)fenol
Fórmula empírica	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂
Nº C.A.S.	3380-34-5
Peso molecular	289,54 gr/mol
Solubilidad en agua	10 mg/L a 20°C

Figura 4. Estructura molecular y propiedades físico-químicas del triclosán.

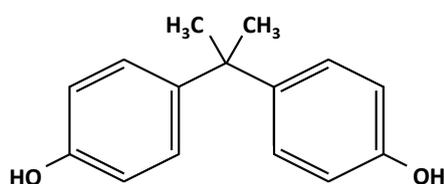
A pesar de que este xenobiótico está considerado como apto para su uso (USEPA, 2008), se han descrito alteraciones a nivel de sistema endocrino producidos por el TCS en diferentes organismos, principalmente a nivel del sistema tiroideo en anfibios (Veldhoen y col., 2006; Fort y col., 2010; Helbing y col., 2010) y en ratas (Zorrilla y col., 2009; Paul y col., 2010a, 2010b). Además se ha descrito en cultivos de células humanas su capacidad de desplazar el estradiol y la testosterona de sus receptores (Gee y col., 2008) así como de reducir la actividad transcripcional dependiente de testosterona (Chen y col., 2007) y de receptores de andrógenos y estrógenos (Ahn y col., 2008).

En cambio, los estudios sobre los efectos del TCS en invertebrados son más limitados, analizándose principalmente la supervivencia (Orvos y col., 2002; Tatarazako y col., 2004), las alteraciones en cuanto a la producción de estrés oxidativo (Lin y col., 2012; Matozzo y col., 2012; Wang y col., 2014) y la genotoxicidad (Binelli y col., 2009a, 2009b; Lin y col., 2012). En la actualidad, se desconocen los efectos que produce este compuesto sobre el sistema endocrino de invertebrados.

5.3. Bisfenol A

El bisfenol A (BPA) es uno de los productos químicos más empleados en el mundo y con mayor volumen de producción, alcanzando 3,8 millones de toneladas al año (Michałowicz, 2014). Se encuentra clasificado en la lista europea como uno de los 564 potenciales disruptores endocrinos con el máximo nivel de riesgo (nivel III) y más recientemente se ha incluido en la lista prioritaria de los 66 compuestos de mayor riesgo. El BPA constituye el monómero del que se compone el plástico policarbonato (Figura 5), empleado en una gran variedad de productos industriales y de bienes de consumo de uso diario. Además se encuentra presente en las resinas epoxi, que recubren el interior de multitud de recipientes y de envases destinados a estar en contacto con alimentos y bebidas con el fin de prevenir en ellos efectos de oxidación y corrosión, y en las resinas de poliéster. A pesar de que la vida media del BPA en el medio ambiente es corta, su presencia en los ecosistemas es

persistente debido a su liberación de manera continua, la cual puede producirse durante la fabricación de productos químicos, el transporte y el procesamiento. Las fuentes de liberación posteriores a su consumo son, principalmente, a través de la descarga de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales, la lixiviación de los vertederos, la combustión de los residuos domésticos, así como la descomposición natural de los plásticos en el medio ambiente.



Propiedades físico-químicas	
Fórmula química	2,2-bis-4'-hidroxifenil propano
Fórmula empírica	$(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$
Nº C.A.S.	80-05-7
Peso molecular	228,29 gr/mol
Solubilidad en agua	300 mg/L a 25°C

Figura 5. Estructura molecular y propiedades físico-químicas del bisfenol A.

El BPA ha alcanzado gran interés por parte de la sociedad porque se ha demostrado que la principal vía por la que llega a nuestros cuerpos es a través de la alimentación (Lakind y Naiman, 2011) debido a que puede migrar desde los envases hasta los alimentos (Mercea, 2009; Nam y col., 2010). Teniendo en cuenta los efectos adversos del BPA sobre diferentes organismos y su capacidad de pasar desde los envases de policarbonato a los alimentos y al agua, algunos países han prohibido su empleo en la producción de plásticos de los biberones y en recipientes para alimentos infantiles, siendo Canadá el primero en el año 2008, seguido por la Unión Europea desde el 1 de junio de 2011 (Directiva 2011/8/UE) y por EE.UU. en 2013.

Se ha descrito que el BPA es capaz de unirse a diferentes tipos de receptores, entre los que se encuentran los receptores de estrógenos y de andrógenos así como el receptor de aril hidrocarburos y del receptor activado por los proliferadores de peroxisomas (PPAR), los cuales están implicados en la regulación del sistema endocrino y de otros sistemas del organismo (Wetherill y col., 2005; Welshons y col., 2006; Iso y col., 2006; Ziv-Gal y col., 2013). Por otro lado, se ha demostrado que el BPA presenta actividad disruptora endocrina en numerosas especies de vertebrados (Crain y col., 2007), en las que provoca alteraciones en la reproducción y el desarrollo, en el sistema inmune y el sistema nervioso (O'Connor y Chapin, 2003).

En cambio, los estudios sobre el efecto disruptor endocrino del BPA en invertebrados son más limitados. Se ha descrito que este xenobiótico produce la superfeminización en el molusco *Marisa cornuarietis*, en los que conduce a la formación de órganos femeninos adicionales, glándulas sexuales agrandadas y la estimulación en la producción de huevos (Oehlmann y col., 2000, 2006). Además

produce efectos disruptores endocrinos en otros moluscos (Duft y col., 2003; Jobling y col., 2004), en crustáceos (Andersen y col., 1999; Schirling y col., 2006) y en insectos (Watts y col., 2001, 2003; Hahn y col., 2002; Izumi y col., 2008; Mihaich y col., 2009; Rankin y Grosjean, 2010; Michail y col., 2012). A pesar de estas evidencias sobre el sistema endocrino de invertebrados no se ha caracterizado la interacción del BPA con los receptores endógenos en invertebrados.

6. BIOMARCADORES

La biomonitorización de los ambientes acuáticos y la evaluación de la salud de los ecosistemas desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de estrategias efectivas para la protección del medio ambiente, la salud humana y el desarrollo sostenible. Uno de los objetivos en los estudios de toxicología es la búsqueda de biomarcadores que puedan ser empleados como indicadores de exposición del organismo a sustancias tóxicas o como indicadores de los efectos que producen o han producido estos compuestos sobre el individuo. En 1990 McCarthy y Shugart definieron biomarcador como la *“medida a nivel molecular, bioquímico o celular en poblaciones naturales de hábitats contaminados o en individuos expuestos de forma experimental a los químicos, que indica que el organismo ha estado en contacto con compuestos tóxicos y la intensidad de la respuesta al contaminante en el organismo”* (McCarthy y Shugart, 1990). Esta definición la completaron para el caso de la ecotoxicología Van Gestel y Van Brummelen en 1996 como *“cualquier respuesta biológica frente a un químico ambiental a nivel sub-individual, medido en el organismo o en sus productos, indicando una alteración respecto a su estado normal, no pudiendo ser detectado a partir del organismo completo. De esta manera se puede restringir a parámetros bioquímicos, fisiológicos, histológicos o morfológicos”* (Van Gestel y Van Brummelen, 1996).

Los biomarcadores de exposición a la contaminación han sido ampliamente utilizados en los últimos años para monitorizar la salud de los organismos y por tanto, valorar el estado medioambiental. En este sentido, la presencia de compuestos tóxicos en el ambiente puede modular la expresión de diferentes genes, siendo el análisis de los perfiles de expresión génica una herramienta poderosa en los estudios de ecotoxicología. Estos análisis permiten evaluar la respuesta específica al compuesto tóxico de los miles de genes que poseen los organismos y resultan una aproximación útil para comprender los efectos dañinos provocados por la exposición a compuestos químicos.

En el presente trabajo se pretende estudiar las alteraciones producidas por la exposición a NP, TCS y BPA sobre larvas de *C. riparius* analizando diferentes parámetros moleculares, bioquímicos y celulares, que incluyen la actividad transcripcional de genes implicados en el sistema endocrino, en la

respuesta a estrés celular y en el mecanismo de detoxificación, la actividad de una enzima implicada en la detoxificación y el daño en el ADN, valorando su posible utilidad como biomarcadores de exposición temprana y tardía a estos xenobióticos.

6.1. Biomarcadores del sistema endocrino

Las hormonas y el sistema endocrino de invertebrados no son completamente análogos a los de los vertebrados. Comparado con los sistemas endocrinos de los vertebrados, los de invertebrados presentan una mayor diversidad (Taenzler y col., 2007), en los que las hormonas juegan un papel importante a lo largo de todo el ciclo de vida de los insectos (Tassou y Schulz, 2009). El crecimiento y la metamorfosis completa desde el huevo hasta el estado adulto que sufren los insectos holometábolos, entre los que se encuentran los dípteros, se regula principalmente por dos tipos de hormonas, las ecdisoesteroides y la hormona juvenil (Riddiford, 1993). Estos insectos atraviesan diferentes estadios larvarios hasta que alcanzan el estado de pupa, en el que se producen importantes cambios a nivel fisiológico y morfológico, dando lugar al estado adulto sexualmente maduro. Cada estadio va precedido por picos de liberación de ecdisona, la cual determina junto con la hormona juvenil la muda y metamorfosis (Riddiford, 1978; Berger y col., 1992; Talbot y col., 1993).

Durante la muda y la metamorfosis se produce una serie de cambios en los patrones de expresión génica, coordinados y sincronizados por hormonas ecdisoesteroideas, como la ecdisona (Riddiford, 1993; Sekimoto y col., 2006). Estos procesos se inician con la secreción de la hormona protoracicotrópica, una neurohormona producida por las células neurosecretoras, la cual activa la glándula protorácica para sintetizar la hormona ecdisona a partir del colesterol y estimula su liberación. La ecdisona es una prohormona que se convierte a la forma fisiológicamente activa, 20-hidroxiecdisona, en diferentes tejidos diana periféricos (Gilbert y col., 2002) e induce la metamorfosis a adultos cuando se produce un pulso de la misma al final de la etapa larvaria (Richards, 1981). La hormona juvenil, que se sintetiza y libera desde los *corpora allata*, inhibe la metamorfosis hasta que el desarrollo larvario se completa (Figura 6). La concentración de la hormona juvenil es máxima durante el inicio de la vida larvaria, descendiendo a niveles mínimos al final del estado de pupa, en la que se produce la metamorfosis al estado adulto cuando esta hormona desaparece de la circulación. Así, el desarrollo normal de un insecto depende de las concentraciones precisas de cada una de las hormonas en los diferentes estadios.

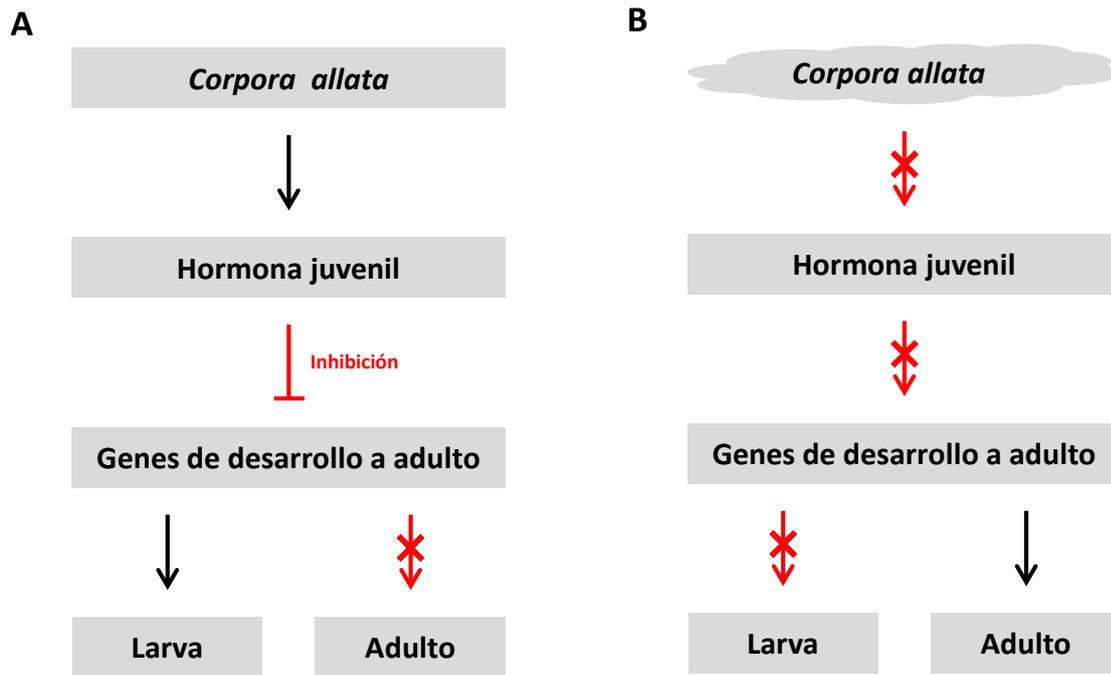


Figura 6. El paso de estadio larvario a adulto se controla mediante los niveles de hormona juvenil. (A) En el *corpora allata* se produce la hormona juvenil, la cual inhibe la expresión de los genes que controlan el desarrollo a estado adulto. (B) En el último estadio larvario se produce la atrofia de los *corpora allata*, disminuyendo los niveles de hormona juvenil, lo que permite la expresión de los genes de desarrollo a adulto.

La hormona 20-hidroxiecdisona se une al receptor de ecdisona, un receptor nuclear heterodimérico formado por el receptor de ecdisona (EcR) y el ultraespiráculo (USP) (Lezzi y col., 1999), el cual, una vez activado por la unión de la hormona, actúa como factor de transcripción que activa el promotor de los genes de respuesta hormonal, iniciando la cascada de cambios en la expresión de genes responsables de las transformaciones producidas durante el desarrollo de los insectos. Ashburner y colaboradores (1974) propusieron un modelo a partir de observaciones de zonas de alta actividad transcripcional, denominados *puff*, en los cromosomas politénicos de glándulas salivales tras pulsos de ecdisona. Según este modelo, esta hormona induce la síntesis de genes tempranos los cuales desencadenan la activación de la expresión de genes tardíos. Los genes tempranos son factores de transcripción que producen dos tipos diferentes de respuesta secundaria, así algunos de estos factores reprimen la transcripción de los genes de la respuesta temprana mientras que otros inducen la transcripción de los genes tardíos (Ashburner y col., 1974; Ashburner y Richards, 1976). La unión de la ecdisona al receptor nuclear EcR/USP activa la transcripción de los genes *E74*, *E75*, *E93* y *broad* (Koelle y col., 1991; Karim y Thummel, 1992; Yao y col., 1993), que codifican para proteínas que actúan como factores de transcripción de respuesta temprana a la ecdisona, activando la transcripción de genes de respuesta tardía (Figura 7). Los cambios en los patrones de expresión

desencadenados por la ecdisona son los responsables de la mayoría de las transformaciones que sufren los insectos durante su desarrollo (Yao y col., 1992, 1993).

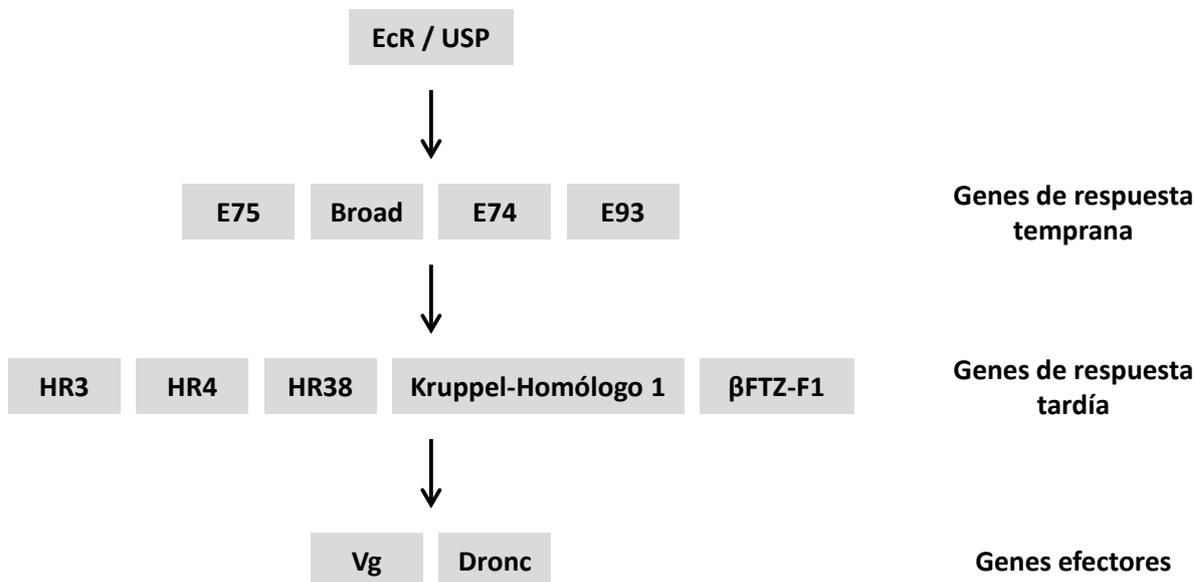


Figura 7. Ruta hormonal de la ecdisona. La unión de la ecdisona al heterodímero EcR/USP constituye el inicio de la cascada de transcripción.

Además del receptor de ecdisona, en los insectos existen otros receptores nucleares de hormonas que pueden desempeñar un papel en el sistema endocrino. Este es el caso del receptor relacionado con estrógeno (ERR, *Estrogen-Related Receptor*), el cual fue de los primeros receptores nucleares huérfanos descritos (Giguère y col., 1988). Se identificó basándose en su similitud de secuencia con los receptores de estrógeno (ERs), además el análisis filogenético confirmó que pertenece al grupo de receptores de hormonas esteroideas (Laudet, 1997), compartiendo tanto estructura como ligandos sintéticos con los ERs (Chen y col., 2001), aunque el estradiol y otros estrógenos naturales no constituyen ligandos del ERR (Giguère y col., 1988; Yang y col., 1996). Se han descrito tres subfamilias de ERRs en mamíferos: ERR α , ERR β y ERR γ (Giguère y col., 1988; Hong y col., 1999), aunque los homólogos en invertebrados no han sido bien caracterizados. Se han identificado genes *ERR* en la mosca *D. melanogaster* (Laudet, 1997), en la hormiga *Polyrhachis vicina* (Ouyang y col., 2009), en el grillo *Teleogryllus emma* (He y col., 2010) y en el mosquito *C. riparius* (Park y Kwak, 2010). Los ERRs poseen la estructura típica de los receptores nucleares, compartiendo con los ERs un sitio de unión a ADN, pero difieren respecto a su dominio de unión al ligando (Giguère, 2002).

El receptor de ecdisona y el ERR pertenecen a la familia de receptores nucleares de hormonas, los cuales constituyen una gran familia de factores de transcripción y tienen el control esencial del desarrollo y de diferentes rutas fisiológicas (Mangelsdorf y col., 1995). Los receptores nucleares

están evolutivamente muy conservados y constituyen una familia génica muy diversa, pudiendo trazarse su filogenia desde metazoos hasta los cnidarios.

En este trabajo de investigación se plantea el estudio de los genes que codifican para el heterodímero receptor de ecdisona EcR/USP, la proteína de respuesta temprana a la ecdisona E74 y el ERR de *C. riparius*. Estos genes se han seleccionado debido a la especial relevancia de los efectos a nivel ecotoxicológico de los EDCs y a la falta de información sobre los mecanismos de acción de estos compuestos en las rutas endocrinas de invertebrados. Para ello se analizará la expresión de los genes de los receptores nucleares como potenciales biomarcadores, ya que representan un elemento clave en el desarrollo y fisiología de estos insectos.

6.2. Biomarcadores de la respuesta a estrés celular

Cuando las células se someten a fuertes variaciones del medio ambiente se produce la respuesta a estrés celular, que se caracteriza por la activación de un conjunto de genes implicados en la supervivencia celular para contrarrestar los daños fisiológicos producidos por agentes físicos o químicos. La respuesta a estrés celular se describió por primera vez tras la exposición de larvas de *Drosophila buschii* a temperaturas elevadas, en las que se observó la aparición de *puff* en los cromosomas politénicos de las glándulas salivales y la desaparición de otros existentes (Ritossa, 1962), los cuales se relacionaron posteriormente con la transcripción de los genes que codifican para las proteínas de choque térmico (HSPs, *Heat Shock Proteins*) (Tissières y col., 1974). La familia de las HSPs contrarresta el estrés celular y el daño asociado al mismo (Feder y Hoffman, 1999; Nollen y Morimoto, 2002), permitiendo a las células sobrevivir en condiciones adversas y adaptarse a ellas.

Las HSPs son una familia de proteínas altamente conservada, las cuales están presentes en todos los tipos celulares. Aunque desempeñan funciones importantes en diferentes procesos fisiológicos bajo condiciones normales de crecimiento (Hartl y Hayer-Hartl, 2002), son especialmente importantes cuando las células se encuentran en condiciones de estrés, para mantener el correcto plegamiento de las proteínas (Nollen y Morimoto, 2002; Silver y Noble, 2012). En condiciones normales de crecimiento los genes de las HSPs se expresan en bajos niveles, pero su transcripción aumenta como parte de la respuesta rápida a diferentes formas de estrés ambiental, incluyendo calor, presencia de compuestos químicos, estrés oxidativo, campos magnéticos e hipoxia, entre otros. Los genes de las HSPs constituyen un subconjunto de genes que codifican para proteínas chaperonas, las cuales desempeñan un papel importante ayudando al correcto plegamiento de las proteínas nacientes, así como también actúan cuando las proteínas desnaturalizadas se acumulan en las células, evitando su agregación irreversible y su plegamiento incorrecto (Hartl y Hayer-Hartl, 2002; Sørensen y col., 2003).

Las HSPs se clasifican en cinco familias diferentes dependiendo de su peso molecular, la homología de la secuencia de aminoácidos y las funciones: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y las HSP de bajo peso molecular (sHSP, *small HSP*) (Gupta y col., 2010).

La familia HSP70 es una de las más conservadas a nivel evolutivo y se inducen bajo una amplia variedad de condiciones de estrés (Mayer y Bukau, 2005). Dentro de esta familia se encuentra la proteína HSP70, que se induce tanto por exposición a alta temperatura como por otros factores de estrés. Actúan como chaperonas estabilizando los precursores proteicos sin plegar, disolviendo los agregados insolubles y replegando los polipéptidos (Kim y col., 2013).

La familia HSP de bajo peso molecular incluye a las HSPs con un peso molecular comprendido entre 10 y 30 kDa. Constituyen la familia de HSPs más diversa y menos conservada, a excepción del dominio α -cristalino de 80-100 aminoácidos que todas comparten (Denlinger y col., 2001). Desempeñan un importante papel frente a condiciones adversas del medio ambiente: temperatura extrema, oxidación, radiación ultravioleta, metales pesados y presencia de compuestos tóxicos (Reineke, 2005; Waters y col., 2008), aunque también están implicadas en una variedad de procesos biológicos como el crecimiento celular, la apoptosis, la diferenciación, la diapausa, la fluidez de la membrana y la resistencia a la inanición en insectos (Arrigo, 1998; Tsvetkova y col., 2002; Morrow y col., 2004; Hao y col., 2007; Gkouvitass y col., 2008). La mayoría de las sHSPs forman oligómeros de alto peso molecular bajo condiciones de estrés, los cuales son necesarios para su actividad chaperona (Leroux y col., 1997b).

Dentro de la familia de las sHSPs se encuentra la HSP27, la cual se expresa de manera constitutiva bajo condiciones normales de crecimiento, pero su expresión aumenta a altos niveles bajo diferentes situaciones de estrés. Está implicada en la supervivencia celular en condiciones de estrés (Landry y col., 1989; Lavoie y col., 1995; Mehlen y col., 1995; Garrido y col., 1997) y participa en la apoptosis (Mehlen y col., 1996) y la organización de microfilamentos en respuesta a factores de crecimiento o estrés (Lavoie y col., 1993; Huot y col., 1996, 1997). La HSP27 forma complejos de alto peso molecular cuya función es adherir a su superficie proteínas desnaturalizadas por calor, impidiendo su agregación y manteniéndolas correctamente plegadas (Jakob y col., 1993; Ehrnsperger y col., 1997a, 1997b).

Por tanto, la expresión de las HSPs es crítica para el mantenimiento de la homeostasis celular en respuesta a cambios medioambientales, actuando como sensores de estrés, por lo que se han propuesto como biomarcadores para estudiar el efecto tóxico producido por compuestos químicos y

por parámetros físicos (Gupta y col., 2010), los cuales están adquiriendo una gran importancia debido al impacto humano en los ecosistemas naturales.

6.3. Biomarcadores del sistema de detoxificación celular

A lo largo de la evolución los seres vivos han estado expuestos de forma continua a compuestos químicos extraños procedentes del entorno y que pueden introducirse en su interior. Para evitar el daño que estos compuestos pueden producir, los seres vivos han desarrollado sistemas metabólicos para favorecer su eliminación. El metabolismo de compuestos exógenos normalmente implica dos etapas diferentes, denominadas como fase I y fase II. Las reacciones de fase I incluyen reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, las cuales catalizan la adición de grupos o funciones de carácter polar, mientras que las reacciones de fase II implican reacciones de conjugación, obteniéndose finalmente productos más hidrosolubles, lo que facilita su eliminación (Figura 8).



Figura 8. Sistema de detoxificación celular. Mediante el sistema de detoxificación celular se metabolizan los compuestos exógenos a la célula mediante una serie de reacciones químicas.

Dentro de las enzimas que actúan en la fase I del sistema de detoxificación destaca la familia del citocromo P450 (P450) monooxigenasa. La familia P450 es una de las familias más amplias y antiguas y se encuentran presentes a lo largo de toda la filogenia (Nelson, 1999). Las enzimas P450 son hemoproteínas implicadas tanto en el metabolismo de compuestos endógenos como de compuestos exógenos. Catalizan una amplia variedad de reacciones enzimáticas, principalmente debido al gran número de genes *CYP* que las codifican, alcanzando hasta cien genes en insectos, los cuales evolucionaron a partir de un gen ancestral común (Feyereisen, 1999). Además tienen una baja especificidad por el sustrato, lo que permite metabolizar gran cantidad de productos xenobióticos diferentes. Las reacciones que llevan a cabo las enzimas P450 son reacciones de monooxigenación dependientes de NADPH, en las que se emplea oxígeno molecular.

Además, las enzimas P450 de insectos están implicadas en la síntesis y degradación de hormonas endógenas (Gilbert y Warren, 2005), incluyendo las hormonas ecdiesteroides y la hormona juvenil (Kayser y col., 1997; Guittard y col., 2011); en este sentido se han relacionado las exposiciones a xenobióticos con las funciones endocrinas de los genes *CYP* (Le Goff y col., 2006). Existen seis familias

génicas *CYP* en insectos, de las cuales cinco son específicas de insectos (*CYP6*, *CYP9*, *CYP12*, *CYP18*, *CYP28*) y una se encuentra también presente en vertebrados (*CYP4*) (Feyereisen, 1999). La familia *CYP4* consta de veintidós subfamilias (Simpson, 1997) y se ha descrito que se induce por la presencia de xenobióticos para su metabolización (Feyereisen, 2006).

Entre las diferentes enzimas implicadas en la fase II del sistema de detoxificación destaca la familia de la glutatión S-transferasa (GST), que cataliza la reacción de conjugación del xenobiótico con el grupo tiol del glutatión (GSH), neutralizando los sitios electrófilos que podrían dañar a la célula e incrementando la solubilidad del xenobiótico. Esta reacción constituye el primer paso en la síntesis del ácido mercaptúrico, el cual es un importante grupo de excreción de productos que fueron identificados hace más de cien años en la orina de animales tratados con bromobenceno.

Las GSTs representan el principal grupo de enzimas de detoxificación y están presentes en todos los organismos eucariotas (Hayes y Pulford, 1995). Juegan un papel central en la detoxificación de compuestos tanto endógenos como exógenos y participan en el transporte intracelular, la biosíntesis de hormonas y la protección contra el estrés oxidativo (Enayati y col., 2005). Muchos compuestos que activan las GSTs son sustratos por sí mismos de la GST o son productos que provienen del metabolismo de las enzimas P450, sugiriendo que su activación forma parte de un mecanismo de respuesta adaptativo al estrés por compuestos tóxicos. Las evidencias sugieren que los niveles de expresión de las GSTs son un factor crucial que determina la sensibilidad de las células a un amplio espectro de compuestos tóxicos (Hayes y Pulford, 1995). Se dividen en tres grupos principales basándose en su distribución dentro de la célula: citosólicas, microsomales y mitocondriales (Jakobsson y col., 1996; Sheehan y col., 2001; Robinson y col., 2004). En mamíferos, las GSTs citosólicas se clasifican en ocho clases: GST α , GST κ , GST μ , GST ω , GST π , GST σ , GST θ y GST ζ (Hayes y McLellan, 1999; Board y col., 2000; Sheehan y col., 2001; Pearson, 2005). Hasta la fecha no existen datos de la presencia de GSTs mitocondriales en insectos, centrándose la mayoría de estudios en las GSTs citosólicas. Por extensión de la clasificación de las GSTs de mamíferos, las GSTs citosólicas de insectos se dividen en seis grupos: GST δ , GST ϵ , GST ω , GST σ , GST θ y GST ζ (Chelvanayagam y col., 2001; Ranson y col., 2001, 2002; Ding y col., 2003; Ranson y Hemingway, 2005; Tu y Akgül, 2005; Yu y col., 2008). Las GSTs son proteínas diméricas en las que cada subunidad posee un sitio G hidrofílico y un sitio H hidrofóbico (Armstrong, 1997). Mientras que el sitio G se encuentra altamente conservado en todas las GSTs por su especificidad por el GSH, el sitio H varía entre los distintos tipos de GSTs, permitiendo así una amplia especificidad por una diversidad de sustratos (Eaton y Bammler, 1999).

El estudio mediante la combinación del análisis de expresión del gen *CYP4G* junto con la evaluación de la actividad enzimática de la GST permite analizar en su conjunto cómo responde el sistema de

detoxificación celular frente a la exposición con compuestos xenobióticos, lo que permite su análisis como potenciales biomarcadores para el estudio del efecto de estos compuestos sobre la ruta de detoxificación.

6.4. Daño en el ADN

La genotoxicidad se considera como uno de los parámetros de toxicidad más importantes en los ensayos con compuestos químicos y en la valoración del riesgo ambiental. Las roturas producidas en el ADN por la exposición a diferentes estrés sugieren lesiones premutagénicas y son empleados como marcadores sensibles de genotoxicidad. El daño en el ADN puede producir alteraciones en su replicación, afectando a la viabilidad celular y conduciendo a defectos hereditarios a través de mutaciones en las células de la línea germinal y producir efectos teratogénicos. Las alteraciones producidas a nivel de individuo pueden tener mayores consecuencias a nivel de población, pudiendo afectar a su constitución genética (Depledge, 1998). Además, se ha asociado el daño en el ADN en diferentes organismos acuáticos con crecimiento reducido, desarrollo anormal y reducción de la supervivencia de embriones, larvas y adultos (Shugart y col., 1992; Lee y col., 1999; Steinert, 1999).

Entre las diferentes técnicas para detectar el daño en el ADN se encuentra el ensayo cometa o electroforesis en gel de una única célula (*SCGE, Single Cell Gel Electrophoresis*). Presenta numerosas ventajas frente a otros métodos de evaluación de la genotoxicidad: permite la detección de bajos niveles de daño en el ADN tanto de forma cualitativa como cuantitativa en cualquier tipo de célula eucariota, es una técnica rápida y se puede realizar con un bajo número de células. El ensayo cometa realizado bajo condiciones alcalinas permite la detección de sitios de rotura tanto en hebra sencilla como en doble hebra, además de detectar sitios álcali lábil, de sobrecruzamiento del ADN y de reparación del ADN por escisión. Se considera como una de las pruebas de genotoxicidad más prometedoras desarrolladas en los últimos años para medir el daño en el ADN sobre células individuales, siendo el método más ampliamente utilizado para detectar lesiones en el ADN en el campo de la eco-genotoxicología. Su uso se ha extendido a una gran diversidad de áreas, incluyendo la monitorización medioambiental y ecotoxicología genética (Jha, 2008; Valverde y Rojas, 2009).

La evaluación del daño en el ADN mediante el ensayo cometa se puede medir empleando diferentes parámetros, entre los que se encuentran el porcentaje de ADN en cola, la longitud de la cola, el momento oliva y el momento cola, cada uno de los cuales ofrece una información diferente para el análisis de la genotoxicidad (Figura 9). Por un lado, el porcentaje de ADN en cola muestra el daño total producido por el compuesto genotóxico, mientras que la longitud de la cola es la distancia de la migración del ADN desde la cabeza del cometa hasta el extremo de la cola. En cambio, el momento

oliva relaciona el daño total con la media del tamaño de los fragmentos y el momento cola relaciona el daño total con el fragmento más pequeño.

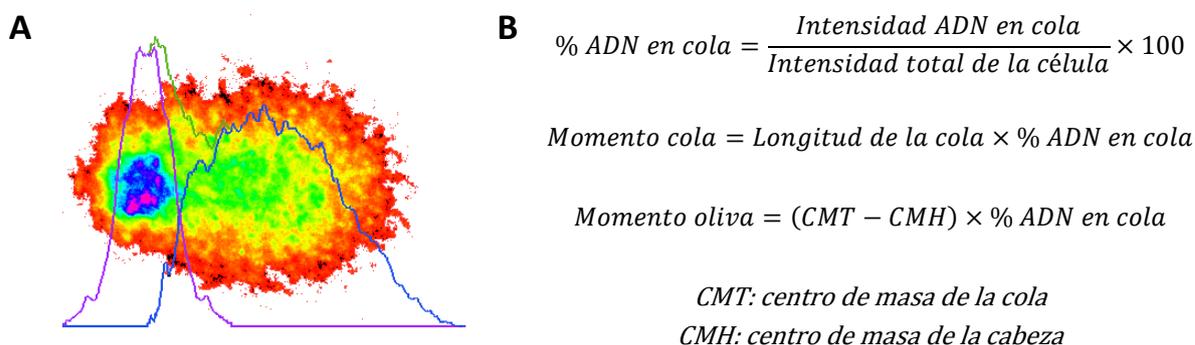


Figura 9. Imagen procesada de un cometa y fórmulas matemáticas para el cálculo de los diferentes parámetros del ensayo cometa. (A) La imagen representa el perfil de intensidad de los píxeles de la cabeza (línea magenta) y de la cola del cometa (línea azul). (B) Fórmulas matemáticas para el cálculo del porcentaje de ADN en cola, el momento cola y el momento oliva. La intensidad de ADN en cola y la intensidad total de la célula indican la suma de los valores de cada píxel de la cola del cometa y de la célula completa respectivamente. El centro de masa de la cola y el centro de masa de la cabeza corresponden con el punto de la imagen que tiene la misma intensidad hacia todos los lados de la cola y de la cabeza respectivamente.

El ensayo cometa se ha empleado en una gran variedad de organismos acuáticos para el estudio de diferentes compuestos genotóxicos (Lee y Steinert, 2003). En larvas de quironómidos se ha descrito daño en el ADN producido por varios xenobióticos, entre los que se encuentran el óxido de tributilo de estaño, metales pesados, octacloro estireno y nanopartículas de plata, además de factores físicos como la irradiación y la desecación (Lee y col., 2008; Gusev y col., 2010; Nair y col., 2011b; Al-Shami y col., 2012; Morales y col., 2013). Es interesante analizar si la exposición a diferentes EDCs presentes en el medio ambiente provoca daño en el ADN, ya que el conocimiento de su potencial genotóxico proporciona una información importante sobre sus efectos, vinculando dicha actividad con otras respuestas biológicas, lo que podría proporcionar una mayor comprensión de los efectos adversos de los xenobióticos en los organismos acuáticos.

A partir de estos planteamientos, la finalidad de esta tesis doctoral ha sido el análisis de los efectos a nivel molecular, bioquímico y celular de los compuestos xenobióticos nonilfenol, triclosán y bisfenol A empleando como organismo de referencia larvas de *C. riparius*. Así, el estudio de los efectos de estos compuestos permitiría identificar nuevos biomarcadores y conocer mejor los mecanismos de acción sobre la ruta endocrina, la respuesta a estrés celular y el sistema de detoxificación, además de sus efectos genotóxicos.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es profundizar en el conocimiento de los efectos citotóxicos y genotóxicos de tres contaminantes frecuentes en los ecosistemas acuáticos y que están clasificados como disruptores endocrinos: nonilfenol (NP), triclosán (TCS) y bisfenol A (BPA). En concreto se pretende identificar biomarcadores moleculares, bioquímicos y celulares de toxicidad acuática en *Chironomus riparius*, díptero ampliamente utilizado como organismo de referencia en ensayos de toxicidad de ecosistemas acuáticos.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización molecular, análisis de la secuencia y localización cromosómica del gen *citocromo P450 (CYP4G)*, del gen de la *proteína de choque térmico 27 kDa (hsp27)* y del gen del *receptor hormonal de la ecdisona (EcR)* en la especie *Chironomus riparius*.
- Determinar los efectos del NP, TCS y BPA a nivel molecular, bioquímico y celular, analizando directamente genes implicados en la ruta hormonal de la ecdisona, la respuesta a estrés celular y el sistema de detoxificación celular, además del daño genotóxico.
- Identificar biomarcadores moleculares de la ruta hormonal de la ecdisona, la respuesta a estrés celular y el sistema de detoxificación para evaluar sus alteraciones tras la exposición a NP, TCS y BPA.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Material biológico

En el estudio de toxicidad de los diferentes compuestos químicos se emplearon larvas de cuarto estadio de *Chironomus riparius* Meigen (Diptera). La población utilizada se estableció a partir de larvas de mosquito recolectadas de poblaciones naturales de Valencia (España) y se ha mantenido en el laboratorio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), siguiendo los protocolos estandarizados para los test de toxicidad (USEPA, 2000; OCDE, 2004).

Las larvas acuáticas se cultivaron en un medio de cultivo compuesto de CaCl₂ 0,5 mM, NaCl 1 mM, MgSO₄ 1 mM, NaHCO₃ 0,1 mM, KH₂PO₄ 0,025 mM y FeCl₃ 0,01 mM suplementado con comida comercial para peces (TetraMin, Tetra) y hojas de ortiga trituradas. Los cultivos se mantuvieron a 18°C, con ciclos de luz/oscuridad de 16/8 horas y con aireación constante.

1.2. Compuestos

Los compuestos químicos empleados fueron 4-nonilfenol (NP) (Fluka), triclosán (TCS) (Sigma) y bisfenol A (BPA) (Aldrich). Como solvente se empleó acetona (VWR) para el NP, mientras que para el TCS y el BPA se utilizó etanol (VWR).

1.3. Reactivos y enzimas

- **Bio-Rad:** *SsoFast EvaGreen SuperMix*
- **Biotoools:** dNTPs, marcador de peso molecular de ADN, Taq ADN polimerasa
- **Cells Biolabs:** *VistaGreen*
- **Conda:** agarosa, Luria Bertani (LB), Luria Bertani-agar (LB-agar)
- **Fluka:** Hoechst 33342
- **Invitrogen:** bacterias competentes *One Shot® DH5α™-T1^R*, medio S.O.C. (*Super Optimal broth with Catabolite repression*), M-MLV, *Prolong Gold Antifade Reagent*, RACE 3', RACE 5', *TOPO TA Cloning*, TRIzol
- **Merck:** cloroformo
- **Promega:** *PureYield Plasmid Miniprep System*, RNasin recombinante
- **Qiagen:** *QIAquick gel extraction kit*
- **Roche:** ADNasa libre de ARNasa, ampicilina, anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fluoresceína, anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con rodamina, ARNasa A, *Dig-Nick*

Translation Mix, DTT (ditiotreitól), *Expand long Template*, inhibidor de proteasas, isopropil-beta-tiogalactósido (IPTG), proteinasa K, X-Gal

- **Sigma**: agarosa de bajo punto de fusión, bromuro de etidio, dietilpírocarbonato (DEPC), fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)
- **Sigma-Aldrich**: *GST Assay kit*
- **Thermo Scientific**: *BCA protein Assay Reagent*
- **VWR**: acetona, ácido acético, etanol, isopropanol

1.4. Soluciones

- **Medio de cultivo de *C. riparius***: CaCl₂ 0,5 mM, NaCl 1 mM, MgSO₄ 1 mM, NaHCO₃ 0,1 mM, KH₂PO₄ 0,025 mM, FeCl₃ 0,01 mM
- **PBS**: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, Na₂HPO₄ 10 mM
- **PBS-Tween 20 0,1 %**: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, Tween 20 0,1 %
- **Solución de hibridación**: formamida 50 %, SSC 4x, SDS 0,4 %
- **SSC**: NaCl 150 mM, citrato Na₃H₂O 15 mM
- **TAE**: tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM
- **Tampón alcalino**: NaOH 300 mM, EDTA 1 mM pH > 13
- **Tampón de carga de geles**: azul de bromofenol 0,25 %, xileno cianol 0,25 %, glicerol 30 %
- **Tampón de electroforesis del ensayo cometa**: EDTA 1 mM, NaOH 0,3 M
- **Tampón de lisis**: Tris-HCl 10 mM, EDTA 100 mM, NaCl 2,5 M, DMSO 10 %, Tritón X-100 10 % pH 10
- **TE**: Tris 40 mM, EDTA 1 mM pH 7,8
- **TES**: NaCl 100 mM, Tris 10 mM, EDTA 2,5 mM, SDS 1 %

1.5. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados se adquirieron en Sigma-Genosys (Tabla I).

Tabla I. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de ADN mediante PCR

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	T ^a de fusión	Objetivo
Actina F	GATGAAGATCCTCACCGAACG	65,8°C	PCR tiempo real
Actina R2	CGGAAACGTTTCATTACCG	61,5°C	PCR tiempo real
GAPDH F	GGTATTTTCATTGAATGATCACTTTG	62,1°C	PCR tiempo real
GAPDH R	TAATCCTTGGATTGCATGTACTTG	63,6°C	PCR tiempo real
L13 F	AACGTGCTTTCCCAAGAC	60,3°C	PCR tiempo real
L13 R	TTGGCATAATTGGTCCAG	59,5°C	PCR tiempo real
EcR rt F	CCATCGTCATCTTCTCAG	56,5°C	PCR tiempo real
EcR rt R	TGCCATTGTTCGTAG	56,3°C	PCR tiempo real

Tabla I. Continuación

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Tª de fusión	Objetivo
USP real F	GCCCAATCATCCGTTAAGTGG	67,3°C	PCR tiempo real
USP real R	CGTTTGAAGAATCCTTTACATCC	62,4°C	PCR tiempo real
ERR F	CTCAGCAAGTAAGGACGAG	57,7°C	PCR tiempo real
ERR R	CGTCTAATAATGTGATCGG	55,5°C	PCR tiempo real
E74 F	TCTTACTGAACTTCTTCAAGATCG	61,6°C	PCR tiempo real
E74 R	GCTTTGAGACAGCTTTGGAATCG	67,9°C	PCR tiempo real
Hsp70 rt F	ACTTGAACCAGTTGAGCGT	60,0°C	PCR tiempo real
Hsp70 rt R	TTGCCACAGAAGAAATCTTG	60,4°C	PCR tiempo real
Hsp27 rt F	TCAACACACAGGACCG	57,2°C	PCR tiempo real
Hsp27 rt R	ATCCTTTATTGGTGATTAATTATG	56,8°C	PCR tiempo real
Cyp450 Race3'-2	TTGCATTGTGCATTTTAGGATGTC	66,6°C	PCR tiempo real
Cyp450 2R	TAAGTGGAAGTGGTGGGTACAT	62,0°C	PCR tiempo real
M13 F	GTAAAACGACGGCCAGT	58,7°C	Secuenciación
M13 R	CAGGAAACAGCTATGAC	50,7°C	Secuenciación
Cyt P450 F	GACATTGATGAGAATGATGTTGGTG	66,3°C	Secuenciación
Cyt P450 2F	ATGGCTGTGGAGCAAATCATTGAGTAGTG	74,0°C	Secuenciación
Cyt P450 3F	CATTGGAGATGAAATATTTGGAA	61,4°C	Secuenciación
Cyt P450 4F	CAATCCACATCAATTGTCTAAGG	62,1°C	Secuenciación
RACE 3' Cyt P450 F	CAATCCACATCAATTGTCTAAGG	62,1°C	Race 3'
RACE 3' Cyt P450 1F	TTGAAGGACATGACACAACCTGC	65,1°C	Secuenciación
RACE 3' Cyt P450 2F	TTGCATTGTGCATTTTAGGATGTC	66,6°C	Secuenciación
Cyt P450 R	TTCCAAATATTTTCATCTCCAATG	61,4°C	Secuenciación
Cyt P450 2R	TAAGTGGAAGTGGTGGGTACAT	62,0°C	Secuenciación
Cyt P450 10R	AATCCGTCAGTTCTCTTCAAGAT	61,9°C	Secuenciación
Cyt P450 11R	AGCTTTGGTCTTTCTTGGTTCC	64,4°C	Secuenciación
5' RACE Cyt P450 1R	AATAATTGGAAGTGCAGTGGTCC	67,6°C	Secuenciación
5' RACE Cyt P450 2R	ATTGAAAATTTTCATGATTTGTGC	61,5°C	Race 5'
Hsp27 3F	AAGGATGGCTTCCAGGTCTGTATGGA	71,9°C	Race 3'
Hsp27 9F	ATGTCATTAGTTCCTACTTTGTGGA	61,5°C	Secuenciación
Hsp27 6R	TGTCTTTACAGTAATTTCACTTGG	58,8°C	Race 5'
Hsp27 7R	GTTTTCTTCAATAACCACC	57,5°C	Race 5'
Hsp27 9R	AAGTCGAGCCGGTCTGTG	67,8°C	Secuenciación
Hsp27 10R	AAGGTCATCCTAAGAACCAACTAATC	62,5°C	Secuenciación
EcR F	AGACGGTTATGAACAGCC	57,6°C	Secuenciación
EcR 1F	ATGAAGACAGAAAACCTTGATTG	57,4°C	Secuenciación
EcR 2F	GAAGTTATGATGTTGCGCATGGC	69,3°C	Secuenciación
EcR 3F	GAGCTGTGCCTCGTTTGC GG	72,5°C	Secuenciación
EcR 4F	TAAGGTTGAACCATTAACTATGC	59,9°C	Secuenciación
EcR 5F	TTACTGAACTACGAACAATGGG	60,5°C	Race 3'
EcR 6F	CTTTTCATTAAAACCTGAGAAACCG	61,7°C	Secuenciación
EcR 7F	ATTCGCAAAGGGCTTCCAGCATTTA	72,7°C	Secuenciación
EcR R	CGAGCCATGCGCAACATC	69,3°C	Secuenciación
EcR 2R	GGAAATTTGCCTCGTGC	61,9°C	Secuenciación
EcR 3R	ATCGTGGCAGTTTTCGGTTT	65,5°C	Secuenciación

Tabla I. Continuación

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	T^a de fusión	Objetivo
EcR 4R	TTCACATGTTAAAGCATTATAATG	57,4°C	Secuenciación
EcR 5R	TTATTATCTCCAAAAGACTGTGAAGC	62,4°C	Race 5'
EcR 6R	TTAGTTTCGATTTATTCGTTCCCG	65,5°C	Secuenciación
EcR 7R	ATCGTTGTTTCTTTGTAGCTCC	61,1°C	Race 5'
E74 3F	GGGTTCCACCACCTATCTGTGGGA	59.8°C	Secuenciación
E74 2R	TCCGGCTTGTCTTGTGCATGCCCA	60.3°C	Secuenciación

2. MÉTODOS

2.1. Extracción de ácidos nucleicos

2.1.1. Extracción de ADN

El ADN genómico se aisló a partir de 25 larvas de *C. riparius*, que se homogeneizaron en 5 mL de tampón TES con proteinasa K (Roche) a una concentración final de 0,2 mg/mL. Tras incubar toda la noche a 65°C se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y se centrifugó. La fase acuosa se recuperó y el ADN se precipitó en presencia de acetato sódico 0,3 M pH 6. Tras centrifugar, se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en agua bidestilada (Maniatis y col., 1990). Posteriormente se añadió 1 µL de ARNasa A (concentración final de 50 µg/mL) y se incubó durante una hora a 37°C. Se volvió a fenolizar y se precipitó siguiendo las condiciones anteriormente descritas. El precipitado se resuspendió en 100 µL de agua bidestilada. La concentración de ADN se cuantificó por valoración espectrofotométrica y se comprobó su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % en TAE.

2.1.2. Extracción de ARN

El ARN se obtuvo a partir de la homogeneización de diez larvas de cuarto estadio de *C. riparius* en 300 µl de TRIzol (Invitrogen). Posteriormente se añadieron 60 µl de cloroformo, se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. A continuación se recogió la fase acuosa que contenía el ARN. Finalmente se precipitó el ARN con un volumen de isopropanol, se centrifugó y el precipitado se resuspendió en agua DEPC.

2.1.2.1. *Tratamiento del ARN con ADNasa*

El ARN total se trató con la enzima ADNasa libre de ARNasas en una mezcla de reacción que contenía 5 µL de tampón de reacción 10x, 1 µL de la enzima ADNasa libre de ARNasa (10 U/µL) (Roche) y agua

DEPC hasta un volumen final de 50 µl. La mezcla de reacción se incubó durante una hora a 37°C, se fenolizó con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y la fase acuosa recuperada se añadió a una columna *Phase lock gel* (5 Prime) junto con un volumen de cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. La fase superior se recuperó y se precipitó con isopropanol. Finalmente la calidad del ARN se estimó en geles de agarosa al 1,5 % en tampón TAE (Sambrook y col., 1989) y se cuantificó por valoración espectrofotométrica.

El rendimiento medio de la extracción de ARN a partir de diez larvas fue de entre 70 y 90 µg.

2.2. Transcripción inversa

La transcripción inversa a partir del ARN total se llevó a cabo empleando la enzima M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) (Invitrogen) en un volumen final de 20 µL y siguiendo las indicaciones de la casa comercial para la obtención del ADN complementario (ADNc) a partir de 0,5 µg de ARN total extraído como se indica en el apartado 2.1.2.

2.3. Amplificación de ADN por PCR convencional

2.3.1. Amplificación de fragmentos de ADN utilizando la enzima Taq ADN polimerasa

Para la amplificación de productos de PCR de pequeño tamaño se preparó una mezcla de reacción compuesta por 2 µL de tampón de PCR 10x, 0,8 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 0,6 µL del oligonucleótido directo (10 µM), 0,6 µL del oligonucleótido reverso (10 µM), 0,4 µL de Taq ADN polimerasa (1 U/µL) (BioTools), 1 µL de molde (ADNc o ADN genómico) y agua bidestilada hasta un volumen final de 20 µL. La reacción de PCR se realizó en un termociclador C1000 (Bio-Rad) y las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C seguidos de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, temperatura de anillamiento durante 30 segundos y elongación a 72°C con un tiempo dependiente del tamaño del fragmento amplificado (a razón de un minuto por cada kilobase), seguidos de una elongación final a 72°C durante 10 minutos.

2.3.2. Amplificación de fragmentos de ADN utilizando la enzima *Expand long Template*

La amplificación de productos de PCR de tamaños esperados superiores a 1000 pb se realizó empleando la enzima polimerasa *Expand Long Template* (Roche) en un volumen final de 50 µL. La mezcla de reacción estaba formada por dos mezclas, una primera que contenía 2,5 µL de dNTPs (10 mM), 5 µL del oligonucleótido directo (10 µM), 5 µL del oligonucleótido reverso (10 µM), 4 µL de molde (ADNc o ADN genómico) y 8,5 µL de agua bidestilada y una segunda que estaba compuesta por 5 µL de tampón 3 de PCR 10x, 1 µL de enzima (5 U/µL) y 19 µL de agua bidestilada. Las dos

mezclas se juntaron justo antes del comienzo de la reacción. La amplificación se realizó en un termociclador C1000 (Bio-Rad) y el protocolo consistió en una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C seguidos de 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, el anillamiento durante 30 segundos con una temperatura dependiente de la pareja de oligonucleótidos seleccionada y la elongación a 68°C con un tiempo dependiente del tamaño del fragmento a amplificar seguido de una elongación final a 68°C durante 10 minutos.

2.4. Electroforesis en geles de agarosa

La separación electroforética del ADN genómico, del ARN y de los productos amplificados por PCR se realizó por el procedimiento descrito por Sambrook y colaboradores (1989) en geles de agarosa del 0,8-1,5 % disueltos en tampón TAE. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma) (0,5 µg/mL) para su visualización con luz ultravioleta mediante el programa *GeneSnap* (SynGene) empleando el transiluminador Chemigenius (SynGene).

2.5. Clonación de fragmentos de PCR en plásmidos

2.5.1. Extracción de ADN de geles de agarosa

Los productos de PCR se sometieron a una electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión y posteriormente se purificaron utilizando el kit comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

2.5.2. Ligación

El plásmido pCR™II-TOPO® 4.0 Kb (Invitrogen) se utilizó para la clonación de productos de PCR generados con la enzima Taq ADN polimerasa. La reacción de ligación se realizó con 10-100 ng del producto de PCR, 2 µL de solución salina, 1 µL de vector (10 ng/µL) y agua bidestilada hasta 20 µL. Posteriormente la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

2.5.3. Transformación

Las cepas de las bacterias competentes *One Shot® DH5α™-T1^R* (Invitrogen) se transformaron mediante choque térmico. Para ello se añadieron 2 µL de la mezcla de ligación sobre 50 µL de las bacterias previamente descongeladas a 4°C. Se incubaron en hielo durante 30 minutos, se aplicó un choque térmico a 42°C durante 30 segundos y se volvieron a incubar en hielo durante 5 minutos. A continuación se añadieron 250 µL de medio S.O.C., se incubó la mezcla durante una hora a 37°C y

finalmente se sembraron sobre placas de LB agar (Luria-Bertani agar) (Conda) con ampicilina (100 µg/mL), 100 µL de IPTG (100 mM) (Roche) y 62,5 µL de X-Gal (20 mg/mL) (Roche).

2.5.4. Selección

Para la selección de las colonias por color se utilizó IPTG y X-Gal, tal y como se indica en el apartado anterior. Para confirmar la presencia y el tamaño del fragmento insertado, a partir de las diferentes colonias seleccionadas se hizo una PCR siguiendo las indicaciones del apartado 2.3.1 y empleando los oligonucleótidos M13 F y M13 R (Tabla I) con una temperatura de anillamiento de 54°C y 90 segundos de elongación.

La colonia con el fragmento de interés se sembró en medio de cultivo LB con ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL y se incubó durante toda la noche a 37°C.

2.5.5. Purificación del plásmido

Las preparaciones de ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos se hicieron siguiendo el protocolo del kit comercial *PureYield Plasmid Miniprep System* (Promega).

2.6. Obtención de la secuencia del ARN mensajero de los genes *CYP4G*, *hsp27* y *Ecr*

2.6.1. Amplificación del ADN complementario del gen *CYP4G*

Los oligonucleótidos Cyt P450 F, Cyt P450 2F y Cyt P450 2R (Tabla I) se diseñaron a partir de regiones con alta identidad de secuencia obtenidas tras el alineamiento de las secuencias del *Cyt P450* de *Chironomus tentans* (AY880065.1) y *Antheraea pernyi* (GU205081.1) mediante el programa ClustalW.

A partir de la pareja de oligonucleótidos Cyt P450 F y Cyt P450 2R se amplificó un fragmento de ADN de 340 pb utilizando como molde ADNc obtenido como se indica en el apartado 2.2. La amplificación se realizó empleando la enzima Taq ADN polimerasa tal y como se indica en el apartado 2.3.1 con una temperatura de anillamiento de 55°C y un tiempo de elongación de 30 segundos. Este fragmento se purificó y se secuenció con los oligonucleótidos Cyt P450 F y Cyt P450 2R.

A continuación, a partir del ADNc se amplificó un producto de PCR de 1288 pb con la pareja de oligonucleótidos Cyt P450 2F y Cyt P450 2R empleando la enzima *Expand Long Template* como se indica en el apartado 2.3.2 con una temperatura de anillamiento de 55°C y una elongación de 90 segundos. El producto de PCR se purificó y se secuenció con los oligonucleótidos Cyt P450 2F, Cyt P450 2R y RACE 3' Cyt P450 F (diseñado a partir de la lectura de este fragmento para completar su secuenciación) (Tabla I). A partir de la secuencia obtenida se diseñaron los oligonucleótidos RACE 3'

Cyt P450 F1, RACE 3' Cyt P450 F2, 5' RACE Cyt P450 1R y 5' RACE Cyt P450 2R (Tabla I) empleados para la amplificación de los extremos 5' y 3' del ADNc.

2.6.2. Amplificación del ADN complementario del gen *EcR*

A partir de la secuencia de un fragmento inicial de 240 pb obtenido con los oligonucleótidos EcR F y EcR R (Planelló y col., 2008) se diseñaron los oligonucleótidos EcR 2F y EcR 2R (Tabla I). Además se diseñaron los oligonucleótidos EcR 3F, EcR 4F y EcR 3R (Tabla I) a partir de regiones con alta identidad de secuencia obtenidas tras el alineamiento de las secuencias del *EcR* de *Drosophila melanogaster* (NM_165461.3) y *Chironomus tentans* (S60739.1) mediante el programa ClustalW.

Empleando la pareja de oligonucleótidos EcR 3F y EcR 2R se amplificó un fragmento de 634 pb utilizando como molde ADNc obtenido como se indica en el apartado 2.2. Este producto se purificó y se secuenció con los mismos oligonucleótidos y a partir de su secuencia se diseñó el oligonucleótido EcR 4R (Tabla I).

Se obtuvo un segundo fragmento de 367 pb mediante la amplificación con los oligonucleótidos EcR 4F y EcR 4R. Este producto de PCR se purificó y se secuenció con estos oligonucleótidos y a partir de su lectura se diseñaron los oligonucleótidos EcR 5R y EcR 7R (Tabla I).

Por otro lado se amplificó otro fragmento con la pareja de oligonucleótidos EcR 2F y EcR 3R, obteniéndose un producto de PCR de 430 pb. Este producto se purificó y se secuenció con los oligonucleótidos EcR 2F y EcR 3R y sobre dicha secuencia se diseñó el oligonucleótido EcR 5F (Tabla I).

Los tres productos de PCR se obtuvieron empleando la enzima Taq ADN polimerasa tal y como se indica en el apartado 2.3.1 con una temperatura de anillamiento de 50°C y un tiempo de elongación de 40 segundos.

2.6.3. Amplificación del extremo 3' del ADN complementario

Para la amplificación del extremo 3' del ADNc de los genes *CYP4G*, *hsp27* y *EcR* se empleó el kit comercial Amplificación Rápida de Extremos de ADNc 3' (RACE 3') (Invitrogen) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. La transcripción inversa se llevó a cabo empleando la transcriptasa reversa *SuperScript II* (Invitrogen) y el oligonucleótido adaptador AP suministrado en el kit comercial.

2.6.3.1. Amplificación del extremo 3' del gen *CYP4G*

Para la amplificación del extremo 3' del ADNc del gen *CYP4G* se empleó la polimerasa *Expand Long Template* y el oligonucleótido RACE 3' Cyt P450 F (Tabla I) junto con el adaptador AUAP

(proporcionado en el kit comercial) obteniéndose un fragmento de 1073 pb. La amplificación se realizó tal y como se indica en el apartado 2.3.2 con una temperatura de anillamiento de 55°C y un tiempo de elongación de 60 segundos. El producto de PCR se purificó y secuenció con los oligonucleótidos RACE 3' Cyt P450 F, RACE 3' Cyt P450 F1 y RACE 3' Cyt P450 F2 (Tabla I).

2.6.3.2. Amplificación del extremo 3' del gen *hsp27*

El oligonucleótido Hsp27 3F se diseñó a partir de una región con alta identidad comparando las secuencias del gen *hsp27* de *Drosophila melanogaster* (NM_079276.4), *hsp27 Ceratitis capitata* (EU700493.1) y *hsp25 Sarcophaga crassipalpis* (EF103577.1) por medio del programa ClustalW.

El extremo 3' del ADNc del gen *hsp27* se amplificó empleando el oligonucleótido específico Hsp27 3F (Tabla I) y el adaptador AUAP obteniéndose un fragmento de 650 pb. La reacción de la PCR se realizó empleando la enzima Taq ADN polimerasa siguiendo las condiciones del apartado 2.3.1 con una temperatura de anillamiento de 55°C y 40 segundos de elongación. El producto de PCR se clonó en el vector pCR II-TOPO (Invitrogen) tal y como se indica en el apartado 2.5 y se secuenció empleando los oligonucleótidos M13 F y M13 R (Tabla I). A partir de la secuencia obtenida del extremo 3' se diseñaron los oligonucleótidos Hsp27 6R y Hsp27 7R (Tabla I).

2.6.3.3. Amplificación del extremo 3' del gen *EcR*

Para la amplificación del extremo 3' del ADNc del gen *EcR* se empleó el oligonucleótido específico *EcR* 5F (Tabla I) y el adaptador AUAP, obteniendo un fragmento de aproximadamente 200 pb. La reacción de PCR se realizó mediante la enzima Taq ADN polimerasa tal y como se indica en el apartado 2.3.1 con una temperatura de anillamiento de 55°C y un tiempo de elongación de 40 segundos. Se purificó el producto de PCR y se secuenció con el oligonucleótido *EcR* 5F.

2.6.4. Amplificación del extremo 5' del ADN complementario

La amplificación del extremo 5' del ADNc de los genes *CYP4G*, *hsp27* y *EcR* se realizó siguiendo las indicaciones del kit comercial Amplificación Rápida de Extremos de ADNc 5' (RACE 5') (Invitrogen). La transcripción inversa se llevó a cabo empleando la transcriptasa reversa *SuperScript II* (Invitrogen) y un oligonucleótido específico para cada gen.

2.6.4.1. Amplificación del extremo 5' del gen *CYP4G*

El ADNc se sintetizó con el oligonucleótido 5' RACE Cyt P450 2R y se amplificó mediante la enzima Taq ADN polimerasa empleando el oligonucleótido 5' RACE Cyt P450 2R y el adaptador AAP

(proporcionado en el kit comercial) obteniéndose un fragmento de aproximadamente 300 pb. Las condiciones de la reacción de PCR fueron las indicadas en el apartado 2.3.1 con una temperatura de anillamiento de 55°C y un tiempo de elongación de 40 segundos. Una vez purificado el producto de PCR se secuenció con los oligonucleótidos 5' RACE Cyt P450 1R y 5' RACE Cyt P450 2R.

2.6.4.2. Amplificación del extremo 5' del gen hsp27

El ADNc complementario al ARN se sintetizó con el oligonucleótido Hsp27 7R (Tabla I). A continuación el extremo 5' se amplificó empleando la enzima Taq ADN polimerasa junto con el oligonucleótido Hsp27 6R y el adaptador AAP obteniéndose un fragmento de 425 pb. Las condiciones de amplificación fueron las indicadas en el apartado 2.3.1 con una temperatura de anillamiento de 55°C y 40 segundos de elongación. El producto de PCR se purificó y se secuenció con el oligonucleótido Hsp27 6R (Tabla I).

2.6.4.3. Amplificación del extremo 5' del gen EcR

La síntesis de ADNc se transcribió con el oligonucleótido EcR 7R (Tabla I). El extremo 5' se amplificó empleando el oligonucleótido EcR 5R y el adaptador AAP, obteniendo un producto de PCR de aproximadamente 300 pb. La reacción de PCR se realizó mediante la Taq ADN polimerasa como se indica en el apartado 2.3.1 con una temperatura de anillamiento de 55°C y un tiempo de elongación de 40 segundos. El producto de PCR se clonó en el vector pCR II-TOPO (Invitrogen) y se secuenció empleando los oligonucleótidos M13 F y M13 R (Tabla I).

2.7. Obtención de la secuencia del ADN de los genes *CYP4G*, *hsp27* y *EcR*

2.7.1. Amplificación del ADN genómico del gen *CYP4G*

El ADN del gen *CYP4G* se amplificó con la polimerasa *Expand Long Template* utilizando los oligonucleótidos Cyt P450 2F y Cyt P450 2R (Tabla I) obteniendo un producto de PCR de 1351 pb a partir de ADN genómico de *C. riparius* extraído como se indica en el apartado 2.1.1 de materiales y métodos. La reacción de amplificación se realizó según las condiciones del apartado 2.3.2 con una temperatura de anillamiento de 55°C y un tiempo de elongación de 90 segundos. A continuación el producto de PCR se purificó y se secuenció con los oligonucleótidos Cyt P450 2F, Cyt P450 2R y 5' RACE Cyt P450 2R. Además se diseñaron los oligonucleótidos Cyt P450 4F, Cyt P450 10R y Cyt P450 11R (Tabla I) a partir de la secuencia del ADNc para completar la amplificación del gen *CYP4G* a partir de ADN genómico. Empleando la enzima Taq ADN polimerasa y los oligonucleótidos Cyt P450 4F y Cyt P450 11R se amplificó un fragmento de 652 pb. En el apartado 2.3.1 se indican las condiciones de la

reacción de PCR, con una temperatura de anillamiento de 55°C y 40 segundos de elongación. El producto de PCR se purificó y se secuenció con los oligonucleótidos Cyt P450 4F, Cyt P450 10R y Cyt P450 11R.

2.7.2. Amplificación del ADN genómico del gen *hsp27*

Para la amplificación del ADN genómico del gen *hsp27* se emplearon los oligonucleótidos Hsp27 9F y Hsp27 9R (Tabla I) diseñados a partir de la secuencia de su ADNc, obteniéndose un producto de PCR de 549 pb. La amplificación se llevó a cabo empleando la enzima Taq ADN polimerasa siguiendo las condiciones indicadas en el apartado 2.3.1 con una temperatura de anillamiento de 55°C y 90 segundos de elongación. Una vez purificado el producto de PCR se secuenció con los oligonucleótidos Hsp27 9F y Hsp27 9R (Tabla I).

2.7.3. Amplificación del ADN genómico del gen *EcR*

Para amplificar la región codificante del gen *EcR* a partir del ADN genómico se empleó la polimerasa *Expand Long Template* junto con los oligonucleótidos EcR 1F y EcR 6R, obteniéndose un fragmento de 1902 pb. Las condiciones de amplificación fueron las indicadas en el apartado 2.3.2 con una temperatura de anillamiento de 55°C y 120 segundos de elongación. El producto de PCR purificado se secuenció con los oligonucleótidos EcR 1F, EcR 3F, EcR 4F, EcR 6F, EcR 7F, EcR 4R, EcR 6R, EcR 7R y EcR rt R.

2.8. Secuenciación

La secuenciación del ADN se realizó en el Servicio de Secuenciación del Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) mediante el método dideoxi en el secuenciador automático ABI 3730XL empleando el kit comercial *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Invitrogen).

2.9. Bioinformática

2.9.1. Cálculo del peso molecular y del punto isoeléctrico de proteínas

El cálculo del peso molecular y del punto isoeléctrico teórico de las secuencias de aminoácidos deducidas en este trabajo se realizó a partir de la herramienta *Compute pI/MW* a través del Portal de Recursos de Bioinformática ExpASY del SIB (*Swiss Institute of Bioinformatics*).

2.9.2. Modelización de la estructura tridimensional de proteínas

Con el objetivo de realizar la caracterización estructural, en este trabajo de investigación se realizaron los modelos de la estructura tridimensional de la proteína CYP4G, así como del dominio α -cristalino de la proteína HSP27 y de los dominios C y E de la proteína EcR. Los métodos para la modelización de la estructura de las proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos pueden agruparse en dos estrategias básicas: *ab initio* y modelado por comparación.

En el método *ab initio* se construyen los modelos tridimensionales sin emplear ningún tipo de información de estructuras previamente resueltas y empleando principios físicos para resolver la estructura de mínima energía. Este método necesita grandes recursos computacionales y su fiabilidad disminuye proporcionalmente con el tamaño de la proteína.

Por otro lado, los métodos comparativos, que son los que se han seleccionado en este trabajo, emplean proteínas molde cuya estructura tridimensional se ha resuelto experimentalmente y a partir de los cuales puede determinarse la topología de la proteína problema. Pueden dividirse en dos grandes bloques: los métodos de modelado por homología y los métodos de reconocimiento de plegamiento.

2.9.2.1. Modelización por homología de la estructura tridimensional de proteínas

En el modelado por homología la estructura de la proteína problema se predice mediante la comparación con la estructura de proteínas homólogas, siendo el método más preciso cuando la identidad de secuencia entre la proteína problema y la proteína molde es superior al 30 %. Se basa en la suposición de que durante la evolución la estructura proteica está más conservada que la secuencia de aminoácidos (Chothia y Lesk, 1986), de manera que dos proteínas homólogas compartirán una estructura tridimensional similar. En este método se pueden distinguir diferentes etapas, que fundamentalmente incluyen la selección del molde y el alineamiento inicial, la corrección del alineamiento, la generación del esqueleto tridimensional, el modelado de los bucles y de las cadenas laterales y la optimización y validación del modelo.

Para la modelización por homología de la estructura tridimensional de proteínas se empleó el servidor Swiss-Model del SIB. El primer paso para llevar a cabo el modelado por homología consistió en la identificación de moldes estructurales mediante el alineamiento de secuencias, para lo cual se realizaron las búsquedas en la base de datos de proteínas del NCBI (PDB) empleando el algoritmo PSI-BLAST a través del servidor BLAST y en la librería de moldes de Swiss-Model (SMTL) mediante BLAST y HHblits en el servidor Swiss-Model. El uso combinado de estos dos métodos garantiza unas

alineaciones correctas tanto en niveles altos como bajos de identidad de secuencia (Sadowski y Jones, 2007). Una vez obtenidos los diferentes moldes, estos se seleccionaron en función de la extensión y de los huecos (*gaps*) del alineamiento entre las secuencias, la identidad de secuencia y el valor E (probabilidad de que un alineamiento sea debido al azar), además de la resolución de la determinación de la estructura tridimensional del molde. A continuación se realizó la construcción del modelo tridimensional a partir del alineamiento entre la secuencia de aminoácidos del molde y de la proteína a estudiar empleando el programa Promod-II. Finalmente se evaluó la calidad del modelo mediante el parámetro QMEAN4 (Benkert y col., 2011), el cual es una función que consta de cuatro descriptores estructurales: el ángulo de torsión entre tres aminoácidos consecutivos, el potencial de solvatación de los residuos y dos potenciales de interacción dependientes de la distancia entre pares de aminoácidos. El modelo se seleccionó en función del parámetro QMEAN4, que presenta unos valores entre 0 y 1, presentando un valor más alto cuanto mejor es el modelo.

2.9.2.2. *Modelización por reconocimiento de plegamiento de la estructura tridimensional de proteínas*

El método de reconocimiento de plegamiento, también denominado como método del reconocimiento del plegado 3D-1D, se empleó para la modelización de la estructura tridimensional de proteínas cuando no se encontraron proteínas molde con homología suficiente en la base de datos del PDB. Este método emplea la información estructural junto con la identidad de secuencia para la búsqueda de las proteínas molde. La premisa fundamental en la que se basa este método es en la existencia de un número limitado de tipos de plegamientos con los que se construye la estructura tridimensional de todas las proteínas.

Para la aplicación de este método de modelado se empleó el servidor I-TASSER (*Iterative implementation of the Threading ASSEmbly Refinement*) de la Universidad de Michigan, que es el servidor mejor valorado según CASP (*Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction*) para la predicción de estructuras proteicas. Inicialmente el programa realiza el análisis de las características de la secuencia de aminoácidos para la búsqueda de diferentes moldes en la base de datos del PDB y sus alineamientos mediante el algoritmo LOMETS.

A partir de estos alineamientos se construye la base de la estructura proteica, la cual proviene de la unión de los diferentes fragmentos identificados en regiones homólogas entre la proteína problema y las proteínas molde, completándose las regiones no alineadas mediante un método *ab initio*, basado en simulaciones de Monte Carlo, seleccionándose los modelos de menor energía y realizándose posteriormente un refinado de la topología global de la estructura. Finalmente se

seleccionó el modelo con el mejor valor C, el cual es la estimación de la calidad de los modelos predichos por I-TASSER. El valor C se calcula en función de los alineamientos con los diferentes moldes y los valores de los parámetros TM y RMSD (desviación cuadrática media). El valor C se encuentra entre -5 y 2, obteniéndose valores más altos cuando el modelo ofrece mayor fiabilidad. Los parámetros TM y RMSD son valores para la medida de la similitud estructural entre dos estructuras, empleadas para medir la precisión del modelo predicho comparado con otras proteínas de estructura conocida. Mientras que el valor del RMSD muestra la distancia promedio de todos los pares de residuos entre dos estructuras, el valor de TM ofrece mayor importancia a los pares de átomos más próximos que a los que están más alejados, haciéndolo más insensible a errores locales.

2.10. Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica citogenética desarrollada por Langer-Safer y colaboradores en 1982 para la detección y localización de secuencias específicas del ADN sobre los cromosomas empleando sondas de ADN marcadas con rodamina o con fluoresceína.

2.10.1. Síntesis de la sonda de ADN

La síntesis de la sonda de ADN se realizó a partir de 1 µg del producto de PCR específico del gen a localizar y empleando 4 µL de la enzima *Dig-Nick Translation Mix* (Roche) y agua bidestilada hasta 20 µL. La mezcla se incubó durante 90 minutos a 15°C y a continuación se detuvo la reacción añadiendo 1 µL de 0,5 M EDTA pH 8 e incubando a 65°C durante 10 minutos. La eficacia de la reacción se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % en TAE. Una vez obtenida la sonda de ADN marcada se preparó la solución de hibridación y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

2.10.2. Preparación de los cromosomas politénicos

La hibridación *in situ* se realizó sobre cromosomas politénicos de glándulas salivales de larvas de cuarto estadio de *C. riparius*. Las glándulas extraídas se fijaron en etanol:ácido acético (3:1) durante 2 minutos y las células se disgregaron con la ayuda de agujas enmangadas en 15 µL de ácido acético al 50 %. A continuación las membranas celulares se rompieron y se separaron los cromosomas ejerciendo presión sobre la muestra con un cubreobjetos. Finalmente la preparación se congeló en nieve carbónica pulverizada durante una hora. Pasado este tiempo se retiró el cubreobjetos y se deshidrató el material en etanol absoluto.

2.10.3. Hibridación con la sonda

Previo a la hibridación con la sonda se secó la preparación, los cromosomas se desnaturalizaron en SSC 2x durante 45 minutos a 65°C, se deshidrataron durante 5 minutos en etanol al 50 % y 5 minutos en etanol absoluto y se dejaron secar completamente. Se incubó la preparación en NaOH 0,07 % durante dos minutos, de nuevo se deshidrató y se dejó secar. Por último se incubó toda la noche en una cámara húmeda con 15 µL de la sonda previamente desnaturalizada durante 10 minutos a 95°C.

2.10.4. Detección de la sonda

Se incubó la preparación con SSC 2x durante 5 minutos para eliminar la sonda no hibridada. A continuación se lavó dos veces con PBS-Tween 20 0,1 % durante 10 minutos y se incubó con 20 µL del anticuerpo antiDIG-TRITC (Roche) para la localización del gen *CYP4G* y el antiDIG-FITC (Roche) para la detección del gen *hsp27* (1:100 en PBS) durante una hora. Posteriormente se lavó dos veces con PBS-Tween 20 0,1 % durante 15 minutos, se incubó con Hoescht 33342 (Fluka) (1:50000 en PBS) durante 3 minutos y se lavó dos veces en PBS durante 10 minutos. Por último se añadió *Prolong Gold antifade reagent* (Invitrogen) a la preparación y se observó en un microscopio de fluorescencia Axiophot (Zeiss) equipado con un sistema de epifluorescencia y una cámara CCD (Photometrics Cool Snap). Para la captura de imágenes se empleó el programa informático *RS Image* (Roper Scientific).

Una vez localizada la sonda en el cromosoma, las imágenes fueron procesadas con el programa informático Adobe Photoshop CS4 (Adobe).

2.11. **Tratamientos experimentales**

Para llevar a cabo los tratamientos experimentales, larvas de cuarto estadio de *Chironomus riparius* se expusieron a concentraciones de 1, 10, 100, 1000 y 10000 µg/L de NP, 1, 10, 100, 1000, 3000 y 10000 µg/L de TCS y 0,5 y 3 mg/L de BPA en medio de cultivo durante diferentes tiempos. Los grupos de larvas control se expusieron al mismo porcentaje de solvente que los tratamientos correspondientes. Cada tratamiento consistió en tres experimentos independientes, en los que las larvas provenían de diferentes masas de huevos. En los tratamientos de 96 horas el medio de cultivo se renovó cada 24 horas y las larvas se alimentaron a las 48 horas con 3 mg de comida comercial.

2.12. **Análisis de la supervivencia**

El análisis de la supervivencia de cada uno de los compuestos xenobióticos se llevó a cabo exponiendo larvas de cuarto estadio de *C. riparius* durante 96 horas y contando el número de larvas vivas cada 24 horas. Se realizaron tres experimentos independientes con 50 larvas para cada

concentración estudiada y se analizaron sus resultados mediante el programa informático DEBtox, que emplea el modelo DEB (*Dynamic Energy Budget Model*), obteniendo los valores de la concentración letal media (LC50) para cada tiempo y del tiempo letal medio (LT50) para cada concentración estudiada.

2.13. Diseño de oligonucleótidos para el análisis de expresión del ARN mensajero

El estudio de los niveles de expresión del ARN mensajero de los genes seleccionados en este trabajo se realizó mediante la técnica de la RT-PCR en tiempo real, para lo cual se diseñó una pareja de oligonucleótidos para la amplificación de fragmentos específicos de cada gen de acuerdo con los siguientes criterios:

- Proximidad al extremo 3' del ARNm.
- Temperatura de anillamiento cercana a 58°C para amplificar simultáneamente todos los genes a estudiar.
- Tamaño del producto de PCR de entre 100 y 200 pb.

Los oligonucleótidos de los genes *CYP4G*, *hsp27* y *Ecr* (Tabla I) se diseñaron a partir de las secuencias obtenidas y depositadas en la base de datos del *GenBank* del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) bajo los números de acceso JN162670.1, KC495957.1 y KJ135024, respectivamente. En el caso de los genes *hsp70* y *ERR* (Tabla I), los oligonucleótidos se diseñaron basándose en la secuencia completa del ARN mensajero del gen, disponible en la base de datos del *GenBank* bajo el número de acceso HM769899.1 (Morales y col., 2011) y GU070740.1 (Park y Kwak, 2010) respectivamente. La especificidad de los oligonucleótidos diseñados se comprobó mediante secuenciación.

Los oligonucleótidos de los genes *actina*, *gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)*, *proteína ribosómica L13 (rpL13)* y *ultraespiráculo (usp)* (Tabla I) se obtuvieron a partir de las publicaciones Planelló y colaboradores (2010), Park y colaboradores (2009), Martínez-Guitarte y colaboradores (2007) y Ozáez y colaboradores (2013), respectivamente.

Para analizar la expresión del gen que codifica para la proteína E74 se diseñaron unos oligonucleótidos a partir de regiones homólogas de este gen con otras especies de insectos. Inicialmente se realizó una búsqueda en la base de datos del *GenBank* de secuencias del ARNm del gen *E74* en especies de insectos filogenéticamente próximas a *C. riparius*. Las especies seleccionadas fueron *Anopheles gambiae* (XM564896.3), *Aedes aegypti* (AF435023.1), *Bombyx mori* (DQ471939.1), *Manduca sexta* (AY170859.1), *Drosophila melanogaster* (X15087.1) y *Tribolium castaneum*

(XM961524.2) y se compararon mediante el programa ClustalW a través de ICBP (*Institut de Biologie et Chimie des Protéines*). Una vez obtenido el alineamiento de las secuencias de nucleótidos se localizaron las regiones más conservadas y se diseñaron los oligonucleótidos E74 3F y E74 2R (Tabla I). Con estos oligonucleótidos se amplificó un fragmento de 162 pb empleando como molde el ADNc de *C. riparius* y posteriormente este fragmento se clonó tal y como se indica en el apartado 2.5 y se secuenció. Una vez obtenida la secuencia, se realizó una búsqueda de ella mediante BLAST para confirmar que el fragmento amplificado presenta homología con el gen *E74* de otras especies de insectos presentes en la base de datos del *GenBank*. Finalmente se diseñaron los oligonucleótidos E74 F y E74 R (Tabla I) sobre la secuencia obtenida para el estudio de los niveles de expresión del ARNm mediante RT-PCR en tiempo real.

2.14. Cálculo de las eficiencias de amplificación de los oligonucleótidos

El estudio de los niveles de expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real requiere el cálculo de la eficiencia de amplificación de la PCR de las diferentes parejas de oligonucleótidos de los genes para emplearla como factor de corrección en el cálculo del valor del ciclo umbral (Ct) (punto de fluorescencia detectada en la fase exponencial de la reacción, donde hay correlación entre la señal de fluorescencia y la cantidad inicial de ADNc). Para calcular el valor de la eficiencia de amplificación de las parejas de oligonucleótidos de cada gen se hicieron cuatro diluciones seriadas 1:2 de un ADNc procedente de una mezcla de diferentes muestras control y de muestras tratadas con compuestos xenobióticos. La mezcla de reacción se preparó con 10 µL de *SsoFast EvaGreen Supermix* (Bio-Rad), 0,6 µL del oligonucleótido directo (10 µM), 0,6 µL del oligonucleótido reverso (10 µM), 1 µL de ADNc y agua bidestilada hasta un volumen final de 20 µL. Las condiciones de amplificación para la reacción de PCR fueron 30 segundos a 95°C seguidos de 35 ciclos de 95°C durante 5 segundos, 58°C durante 15 segundos y 65°C durante 10 segundos incluyendo la lectura de la placa y una curva de desnaturalización que consistió en incrementos de 0,5°C desde 65 a 95°C durante 5 segundos, cada uno con la lectura de placa.

La eficiencia de la amplificación se determinó mediante la pendiente de la regresión lineal, la cual debe ser del 100 % cuando el resultado de una dilución 1:2 da una diferencia de Ct de 1 ciclo. Los niveles de expresión génica se compararon con los valores Ct empleando la eficiencia de la reacción de la PCR como factor de corrección.

Los oligonucleótidos, las eficiencias obtenidas y el tamaño del producto de PCR para cada gen se indican en la tabla II.

Tabla II. Oligonucleótidos empleados en la PCR a tiempo real

Gen	Oligonucleótidos	Eficiencia	Tamaño
<i>Actina</i>	Actina F / Actina R2	104,0 %	201 pb
<i>GAPDH</i>	GAPDH 1F / GAPDH 1R	96,6 %	110 pb
<i>rpL13</i>	L13 F / L13 R	107,1 %	351 pb
<i>CYP4G</i>	P450 RACE 3'-2 / Cyp450 2R	106,0 %	174 pb
<i>EcR</i>	EcR rt F / EcR rt R	106,6 %	180 pb
<i>ERR</i>	ERR F / ERR R	104,7 %	222 pb
<i>Usp</i>	USP real F / USP real R	108,1 %	114 pb
<i>E74</i>	E74 F / E74 R	103,2 %	111 pb
<i>hsp70</i>	Hsp70 rt F / Hsp70 rt R	103,8 %	132 pb
<i>hsp27</i>	Hsp27 rt F / Hsp27 rt R	109,3 %	202 pb

2.15. Análisis de los niveles de expresión mediante RT-PCR

2.15.1. Amplificación

Los genes de interés se amplificaron mediante PCR en tiempo real con un termociclador CFX96 (Bio-Rad). Para ello se preparó la mezcla de reacción en un volumen final de 20 μ L con 10 μ L de *SsoFast EvaGreen Supermix* (Bio-Rad), 0,6 μ L del oligonucleótido directo (10 μ M), 0,6 μ L del oligonucleótido reverso (10 μ M), 1 μ L de ADNc y agua bidestilada. La reacción de PCR se realizó siguiendo las mismas condiciones de amplificación que las empleadas para el cálculo de la eficiencia de los oligonucleótidos, que consistieron en 30 segundos a 95°C seguidos de 35 ciclos de 95°C durante 5 segundos, 58°C durante 15 segundos y 65°C durante 10 segundos incluyendo la lectura de la placa y una curva de desnaturalización que consistió en incrementos de 0,5°C desde 65 a 95°C durante 5 segundos, cada uno con la lectura de placa.

2.15.2. Cuantificación

Los niveles de expresión de los genes de estudio se cuantificaron empleando los valores Ct, cuyos valores para cada muestra se calcularon empleando la eficiencia de la reacción de la PCR como factor de corrección (Pfaffl, 2001; Vandesompele y col., 2002).

Los genes de referencia seleccionados fueron *actina*, *GAPDH* y *rpL13*. Para confirmar que los niveles de expresión de dichos genes de referencia no son alterados por los tratamientos experimentales se utilizaron dos parámetros: CV (Coeficiente de Variación; $CV = 100 \times \frac{\text{desviación estándar}}{\text{media}}$) y valor M (coeficiente de estabilidad calculado mediante el algoritmo geNorm, es la media aritmética de todas las variaciones por parejas; $M_j = \frac{\sum_{k=1}^n v_{jk}}{n-1}$). Los valores de dichos parámetros deben ser inferiores a 0,25 y 0,5, respectivamente (Hellemans y col., 2007).

2.16. Ensayo de la actividad enzimática de la glutatión S-transferasa

2.16.1. Extracción de proteínas

El estudio de la actividad enzimática de la glutatión S-transferasa (GST) se realizó a partir de un extracto proteico de cinco larvas. Las larvas se homogeneizaron en 750 μL de tampón TE junto con inhibidor de proteasas (Roche) a 4°C. A continuación se centrifugó el homogeneizado a 500 rpm durante 15 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, se recogió el extracto proteico y se conservó a -20°C.

2.16.2. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el kit comercial *BCA Protein Assay Reagent* (Thermo Scientific) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

El rendimiento medio de la extracción de proteínas a partir de cinco larvas fue de entre 600 y 750 μg .

2.16.3. Evaluación de la actividad enzimática de la GST

A partir de 25 μg de proteína total de *C. riparius*, obtenida como se ha descrito en el apartado 2.16.1, se evaluó la actividad enzimática de la GST siguiendo las indicaciones del kit comercial *Glutathione S-Transferase (GST) Assay kit* (Sigma-Aldrich) mediante espectroscopia, midiendo la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro V-530 (Jasco) y aplicando la fórmula matemática $Actividad\ GST = \frac{(\Delta A_{340}) / t \times V \times dil}{\epsilon_{mM} \times V_{enz}}$, donde ΔA_{340} indica la diferencia de absorbancia a 340 nm al comienzo y al final de la reacción, t el tiempo de reacción en minutos, V el volumen de reacción en mililitros, dil el factor de dilución, ϵ_{mM} el coeficiente de extinción molar para el CDNB en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y V_{enz} el volumen de enzima.

2.17. Ensayo cometa

El ensayo cometa o electroforesis en gel de una única célula fue desarrollado por Singh y colaboradores en 1988. En ella se combina la simplicidad técnica de la detección de roturas de hebra sencilla y de doble hebra en el ADN, sitios álcali lábil, sitios de sobrecruzamiento del ADN y sitios de reparación del ADN por escisión, con la aproximación celular de ensayo citogenético.

Todo el proceso del ensayo cometa se realizó en oscuridad para evitar el daño que puede producir la luz sobre el ADN.

2.17.1. Preparaciones

La suspensión celular se obtuvo a partir de diez larvas de *C. riparius*. Las larvas se cortaron y se homogeneizaron sobre un cedazo. El homogeneizado se resuspendió en 3 mL de PBS y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 250 µL de PBS. Para determinar el número de células y su viabilidad se hizo la tinción por el método de exclusión empleando como colorante el azul tripán (Sigma-Aldrich) y se contaron las células en una cámara de Neubauer.

Para realizar la electroforesis se mezclaron 10 µL de la suspensión celular (10^6 células/mL) con 100 µL de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % atemperada a 37°C. Sobre un portaobjetos comercial específico para el ensayo cometa (Cell Biolabs) se añadieron 75 µL de la mezcla, dejándola gelificar durante 5 minutos a 4°C. Las membranas de las células embebidas en agarosa se lisaron con un tampón de lisis, atemperado previamente a 4°C para asegurar la estabilidad del gel en el portaobjetos, durante una hora a 4°C. Una vez eliminado el tampón de lisis se incubó 30 minutos a 4°C con el tampón alcalino. A continuación se realizó la electroforesis a 13 voltios y 300 mA durante 25 minutos en tampón de electroforesis del ensayo cometa. El voltaje se determinó a razón de 1 voltio/centímetro de distancia entre los polos de la cubeta de electroforesis y el amperaje se ajustó con el tampón de electroforesis. Una vez finalizada la electroforesis se lavaron los portaobjetos tres veces con agua destilada durante dos minutos y se realizó un lavado final con etanol al 70 % durante 5 minutos. Por último las preparaciones se deshidrataron a 45°C.

La tinción de las preparaciones se realizó con 100 µL de VistaGreen (Cell Biolabs) durante 10 minutos en oscuridad y a continuación se deshidrataron a 45°C. El montaje de las preparaciones se hizo con *Prolong Gold antifade reagent* (Invitrogen) y se observó en un microscopio de fluorescencia Axiophot (Zeiss) equipado con un sistema de epifluorescencia y una cámara CCD (Photometrics Cool Snap). Para la captura de imágenes se empleó el programa informático *RS Image* (Roper Scientific).

2.17.2. Cuantificación de los cometas

A partir de las fotografías obtenidas se cuantificaron 150 células por tratamiento, obteniendo los diferentes parámetros del cometa con el programa *Comet Score* versión 1.5 (TriTek Corp.). Los parámetros elegidos en este estudio para la valoración del daño genotóxico fueron el porcentaje de ADN en cola, la longitud de la cola, el momento cola y el momento oliva.

2.18. Análisis de datos

Los valores LC50 y LT50 en los estudios de supervivencia se calcularon mediante el modelo DEB (*Dynamic Energy Budget Model*) aplicado empleando el programa informático DEBtox. Este modelo tiene en cuenta fenómenos toxicocinéticos relacionados con la supervivencia y la mortalidad, tales como son la absorción y la eliminación del compuesto (Kooijman, 2000) y es el único modelo recogido en la Guía de Aplicación de Datos de Ecotoxicidad de la OCDE (OCDE, 2006b).

El estudio estadístico de los datos para analizar diferencias significativas entre las muestras tratadas y los controles para cada uno de los parámetros analizados se realizó a partir de tres tratamientos experimentales independientes, cada uno de los cuales con tres réplicas. Los niveles de expresión del ARNm de cada muestra se normalizaron frente a los niveles de los genes *actina*, *GAPDH* y *rpL13*. Para el estudio de la actividad enzimática de la GST y de los diferentes parámetros del ensayo cometa los valores se normalizaron respecto al control. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa informático SPSS 19 (IBM) mediante el método paramétrico del ANOVA, analizando previamente la homocedasticidad mediante el test de *Levene*, seguido de un test *post hoc* de *Dunnett*, en el caso de aceptar la homogeneidad de varianzas, o de *Games Howell*, cuando no se asumieron varianzas iguales. En el caso del ensayo cometa, para comparar si había diferencias significativas dentro de una misma concentración entre los dos tiempos estudiados se realizó la prueba *t* de *Student*. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un *p*-valor menor a 0,05.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE SECUENCIAS DE GENES Y PROTEÍNAS EN *Chironomus riparius*

El conocimiento sobre el genoma de *Chironomus riparius* es muy limitado, por lo que fue necesario obtener previamente la secuencia de algunos genes de interés para analizar su respuesta frente a la exposición a diferentes xenobióticos. El punto de partida dependió en cada caso de la información previa existente en *C. riparius*.

1.1. Caracterización molecular del gen *citocromo P450 (CYP4G)*

El sistema enzimático del citocromo P450 comprende una gran familia de proteínas con diferentes e importantes funciones biológicas, entre las que se encuentran el procesamiento de intermediarios de hormonas y su participación en el sistema de detoxificación, cuya función es la eliminación y neutralización de sustancias químicas extrañas al organismo. El citocromo P450 interviene en la fase I del sistema de detoxificación celular y se ha demostrado que su expresión puede alterarse en presencia de diferentes compuestos químicos. En este trabajo se planteó la secuenciación y caracterización molecular del citocromo P450 de la familia 4 subfamilia G de *C. riparius*, ya que la familia 4 metaboliza de manera inducible compuestos xenobióticos (Feyereisen, 2006) y dentro de ella los miembros de la subfamilia G desempeñan un importante papel fisiológico (Feyereisen, 2005).

1.1.1. Identificación y secuenciación del gen *CYP4G*

Para obtener la secuencia del ARN mensajero (ARNm) del gen *CYP4G* de *C. riparius* se diseñaron unos oligonucleótidos situados en regiones conservadas en insectos como se indica en el apartado 2.6.1 de materiales y métodos para su amplificación sobre el ADN complementario (ADNc). A partir del fragmento inicial amplificado con estos oligonucleótidos mediante PCR, se diseñaron otros oligonucleótidos para completar la secuenciación de los extremos 3' y 5' del ADNc.

El ARNm de este gen presenta un tamaño de 2095 pb con un marco de lectura abierto de 1680 pb. Codifica para una proteína de 559 aminoácidos con un peso molecular estimado de 63,9 kDa y un punto isoeléctrico de 8,74. La amplificación sobre ADN genómico mostró la existencia de un intrón de 63 pb presente entre los nucleótidos 402 y 403 del ARNm (Figura 10). La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos se incorporó a la base de datos del *GenBank* del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) con el número de acceso JN162670. El ARNm incluye una región 3' no traducible de 396 pb (sin incluir la cola de poliA) que contiene dos posibles señales de poliadenilación (AATAAA) entre las posiciones 1920-1925 y 2044-2049 del ARNm (Figura 10). La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos mediante el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) mostró una alta identidad de secuencia con proteínas de

la familia del citocromo P450 monooxigenasa, mientras que la presencia de ciertos motivos conservados confirmaron que podía incluirse dentro de la familia 4 y la subfamilia G de los genes *CYP* de insectos. La secuencia de aminoácidos de *C. riparius* presenta un 50 % y un 30 % de identidad con las proteínas P450 de la familia 4 de insectos y de mamíferos respectivamente.

La proteína CYP4G contiene un motivo rico en prolinas cerca del extremo amino-terminal y un motivo de unión hemo cerca del extremo carboxi-terminal, ambos motivos característicos de los citocromos P450 monooxigenasas de los organismos eucariotas. Además, presenta una región rica en P/G (PGPPTVPIIG) presente en otros P450 (Bradfield y col., 1991; Rewitz y col., 2003) (Figura 10). La secuencia consenso WxxxR es el elemento estructural hélice-C, cuya arginina se une al grupo hemo (Rewitz y col., 2006; Feyereisen, 2005). Una región característica de la familia 4, no presente en otros miembros de la familia de las proteínas P450, es una región conservada de trece aminoácidos EVDTFMFEGHDTT (Bradfield y col., 1991), que se encuentra entre los aminoácidos Q₃₅₄ y T₃₆₆ con dos cambios característicos de la subfamilia G: una glutamina (Q) por un ácido glutámico (E) en la posición 354 y una isoleucina (I) por una fenilalanina (F) en la posición 358 (Figura 10). Además está presente el elemento estructural hélice-I con la secuencia consenso GxE/DTT, que forma un posible sitio de unión al oxígeno (Rewitz y col., 2006). La hélice-K, región de unión a hidrógeno, se encuentra en todas las proteínas P450 con la secuencia consenso ExxR (Rewitz y col., 2006), más en concreto la secuencia ETLR está presente en todos los CYP4 descritos hasta el momento excepto en *Bombyx mori* (Bradfield y col., 1991). Una secuencia típica de esta familia de proteínas es A₁XXPXXA₂XPXBA₃, con tres residuos aromáticos (A) y dos prolinas altamente conservadas, siendo la fenilalanina (residuo aromático A₃) el residuo característico de la mayoría de ellos (Gotoh y Fujii-Kuriyama, 1989). Junto a ella, como puede observarse en la figura 10, se encuentra el dominio conservado PERF (PXXFXPE/DRF) (Rewitz y col., 2006), que estabiliza la estructura general de la proteína junto con la hélice K (Hasemann y col., 1995). El motivo PFXXGXRXCXG (situado entre los aminoácidos P₄₉₃ y G₅₀₃) tiene una cisteína que parece ser un ligando importante de la unión hemo junto con la hélice I (Ortiz de Montellano y Graham-Lorence, 1993; Feyereisen, 2005) (Figura 10).

A

```

1 ATGGCTGTGGAGCAAATCATTCAAAGTAGTGTCTTCTCATCCCCACTACTGATGCCTCTCCTCGCAATTGTTTTCT
1 M A V E Q I I Q S S V F S S P L L M P L L A I V F
76 GTTCTAACTGCCGTTCACTTTTGGCAAATGACAAGAAGAGAGAGAAAGATTGGAGATTACTTCCAGGACCACCG
26 V L T A V H F W Q M T R R E R K I G D L L P G P P
151 ACAGTTCCAATTATGGAAACGCTTATATTCTTAAATAGCACAAATCATGgtaatgactagaatggtttgag
51 T V P I I G N A Y Y F L N S T N H
203 gttaagctctgcaaaatataaaactccaatcaatcttagAAATTTTCAATAAAGCCATCGACCTCGTCAACTGC
68 E I F N K A I D L V N C
238 TACGGAAGTGTAGTTCGTGGTGGGTAGGACACAAACTATTCGTGCTCTCAGATCCTCGTGATGTTGAGATT
80 Y G S V V R G W V G H K L F V G L S D P R D V E I
313 ATCTTGGGAAGTCATGATCATATCGACAAGTCTGATGAATATAAATTGTTCCAGCCATGGTTTGGTAATGGTTG
105 I L G S H D H I D K S D E Y K L F Q P W F G N G L
388 TTAATCTCAACTGTGAAAATGGCGAACACACAGAAAACCTATCGTCCAGCCTCCACATGAATGCTTGAAG
130 L I S T V E K W R T H R K L I A P A F H M N V L K
463 AGTTTTATGTCACTTTCAATGACAACAGTCGATTCTGTTATCAAAAAGTTGATGAAGGAAGCTGAAAAGGAATTT
155 S F M S T F N D N S R F V I K K L M K E A G K E F
538 GATTGTCATGACTACATGAGTGAAGCAACTGTTGACATTTTATTGAAAACAGCTATGGGATCGAAAAGAACAAGT
180 D C H D Y M S E A T V D I L L E T A M G S K V T S
613 GAAAGCGAGGAAGTTTAAAGTATGCAATGGCTGTAATGAAAATGTGCGACATCCTTCACAGACGTCAATTCAAA
205 E S E E G F K Y A M A V M K M C D I L H R R Q F K
688 ATCTTTTCAAGATTCGAACCATCTTCACTCTTACCGCATGAAGGAACAACAAAAGAAGTTTTTAGGCATCATC
230 I F S R F E P F F T L T G M K E Q Q K K A K A
763 CACGGTATGACACAACGAGTCCTCAATGAAAAGAAGGCAGTCTTTGACAAGAATTTGTCAGAAGGAAACCTCCCA
255 H G M T Q R V L N E K K A V F D K N L S E G N L P
838 TCACCATCTCCAAGAAATTTAAATCGGACGCATCCGTTGATCAAGCAATTAAGCAAGCAAGCAAGGCA
280 S P S L Q E I I K S D A S V D Q A I K K A K A
913 CAAAATCTCGATGCTGGTCTTCTGATGATCTCGATGATATTGACGAGAATGACGTTGGTAAAAGAGACGTTTG
305 Q N L D A G L R D D L D D I D E N D V G E K R R L
988 GCTTTCCTTGATTGATGATTGAAACTTCTCATTACAATCCACATCAATGTCTAAGGATGAAATTAAGCAACA
330 A F L D L M I E T S H Y N P H Q L S K D E I K Q Q
1063 GTTGATACAATTATGTTGAAGGACATGACACAACGCTGCTGCTGGTCTAGTTTTGCATTGTGCATTTTAGGATGT
355 V D T I M F E G H D T T A A G S S F A L C I L G C
1138 CATCCAGACATTCAAGAGAAAGTTTATCAGGAACAGAAAGCAATTTTCGGTGATTGATCGTGACTGTACATTT
380 H P D I Q E K V Y Q E Q K A I F G D S D R D C T F
1213 GCAGATACATTGGAGATGAAATATTTGGAACGAGTCATTTTGGAGACATTGAGGATGTACCCACCAGTTCCAATT
405 A D T L E M K Y L E R V I F E T L R M Y P P V P I
1288 ATTGCTAGAAAGATTAACAAAGATATCCGCTTGGCATCATGTGATCAAAATGTTCCAGCAGGTTCAACAATGATT
430 I A R K I N K D I R L A S C D Q I V P A G S T M I
1363 ATTGCTACAGTTAAAATCCACCGAAGACCTGACATCTATCCAAACCCAGACAAATTCGACCCCGACAACCTCTTA
455 I A T V K I H R R P D I Y P N P D K F D P D N F L
1438 CCCGAAAAGACATCAACAGACATTATTATGGATTTATCCATTGATGCTGGTCCAGATCATGTTGGACGCT
480 P E R T S N R H Y Y G F I P F S A G P R S C V G R
1513 AAATACGCAATGTTGAAGTTGAAAGTTCTTCTCAGTACAATTATTAGGAACCTCCACATTAAAAGTACAGTTGCA
505 K Y A M L K L K V L L S T I I R N F H I K S T V A
1588 GAGAAAGATTTAAATTAAGCTGATATCATCTTGAAGAGAAGTGCAGGATTTAGAATTAAGTTGGAACCAAGA
530 E K D F K L Q A D I I L K R T D G F R I K L E P R
1663 AAGACCAAAGCTTATTAATGGTATATTAAGCAATAATCTGATATTAAATGGACAATGACTTATGCACACCGCGA
555 K T K A Y
1738 AATATGGACAATTAATGATGGAATATGAACTAGTTTTTAAGCTTCTTACTTTCTGTTTTCTTTCTTGTCTGTG
1813 GGATCATAAATGGTTATGTGGAAGCTCAAAAATGCACGATGACTGAAAATCATGAAAAAATCTGTTTTGAAAAAG
1888 TTTGAGAACCCTGGGTTTATAAATATATTTTAAATAATTTCCAAATGTTCTGGAACCTATGCAATTTCAAGGCC
1963 ATAATTGAAAAAATTAATATATGACTCCAATTTCCGGAATTCGAAATTAATTTCTTAGCCTCAGGTAA
2038 GGAATTAAATAATAGGGTCCGGTCTGGAACCAACGGTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

B

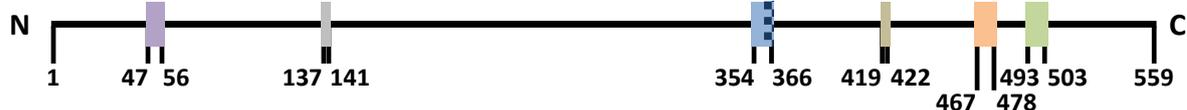


Figura 10. Secuencia del gen *CYP4G* y mapa de los motivos conservados de la proteína *CYP4G*. (A) Secuencia de nucleótidos del gen *CYP4G* y de aminoácidos de la proteína *CYP4G* de *C. riparius*. El gen contiene una región 3' no traducible de 396 pb con dos posibles sitios de poliadenilación AATAAA (rojo) y un intrón de 63 pb (en minúscula). (B) Representación esquemática de los dominios de la proteína *CYP4G*. Los dominios característicos se encuentran marcados sobre la secuencia de aminoácidos: región P/G, PGPPTVPIIG, conservada en proteínas P450 (morado); hélice-C con su secuencia consenso WxxxR (gris); la secuencia EVDTFMFEGHDTT (azul) es característica de los CYP4, que incluye la hélice-I con la secuencia consenso GxE/DTT (subrayado); la hélice-K, con la secuencia consenso ExxR (marrón); secuencia aromática característica de las proteínas P450 A₁XPXXA₂XPXA₃ (naranja); el motivo conservado PFXXGXRXCXG (verde) es la región de unión al hemo.

1.1.2. Determinación de la estructura tridimensional de la proteína CYP4G

La obtención de la estructura tridimensional de la proteína CYP4G se realizó a través del método de reconocimiento de plegamiento utilizando el programa I-TASSER debido a que no existían proteínas que presentaran suficiente identidad de secuencia con la estructura tridimensional resuelta. Además los modelos obtenidos mediante homología empleando Swiss-Model ofrecían unos valores QMEAN4 muy bajos (Tabla III), descartando este método para la modelización de la proteína CYP4G.

Tabla III. Proteínas moldes empleadas en la modelización de la proteína CYP4G de *C. riparius* mediante Swiss-Model

Nº Acceso	Descripción	Identities	Método	Espacios*	Valor E*	QMEAN4
1og5.1.A	<i>Cytochrome P450 2C9</i>	21,10 %	Rayos X 2,55 Å	70/497	3e-27	-7,06
4gqs.1.A	<i>Cytochrome P450 2C19</i>	20,75 %	Rayos X 2,87 Å	74/503	1e-23	-7,47
3czh.1.A	<i>Cytochrome P450 2R1</i>	21,93 %	Rayos X 2,30 Å	4/196	2e-19	-7,67
4ejg.8.A	<i>Cytochrome P450 2A13</i>	21,73 %	Rayos X 2,50 Å	96/513	9e-32	-7,77
4gqs.2.A	<i>Cytochrome P450 2C19</i>	20,75 %	Rayos X 2,87 Å	74/503	1e-23	-8,11
2pg5.1.A	<i>Cytochrome P450 2A6</i>	20,97 %	Rayos X 1,95 Å	80/505	4e-32	-8,28

* Parámetros calculados mediante BLAST

En la figura 11 se muestra la estructura tridimensional de la proteína CYP4G obtenida mediante el programa I-TASSER, la cual presenta un valor C de -0,53, que se encuentra dentro del rango de confianza para este parámetro (-5, 2). Las proteínas moldes empleadas para la construcción de la base estructural se muestran en la tabla IV y el grado de ajuste representado mediante los valores TM y RMSD respecto a las diferentes proteínas moldes están representados en la tabla V. Los valores de TM superiores a 0,5 muestran una correcta topología del modelo diseñado, siendo el valor de 1 el que indica una correlación exacta entre las dos estructuras. Como puede observarse en la figura 11, la proteína CYP4G contiene quince láminas β , localizadas entre los aminoácidos 55-56, 83-88, 91-96, 179-181, 195-197, 200-201, 332-334, 338-340, 445-447, 452-455, 490-491, 523-526, 534-535, 539-542 y 547-553, y diecinueve α -hélices, situadas entre los residuos 3-43, 59-61, 66-79, 99-106, 136-143, 182-194, 203-205, 211-228, 230-276, 281-310, 316-321, 328-340, 348-360, 362-378, 381-396, 404-408, 412-421, 457-460 y 502-520.

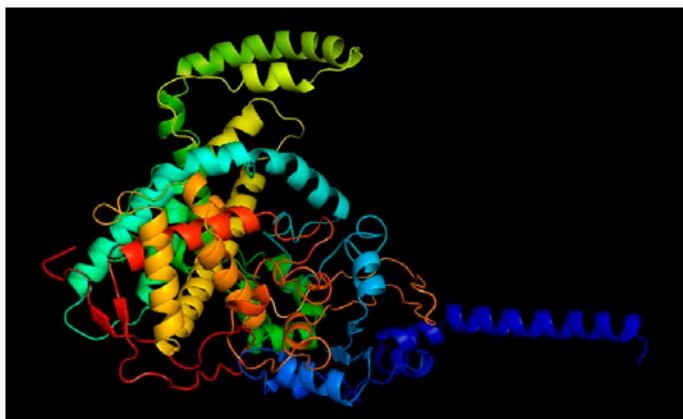


Figura 11. Estructura tridimensional de la proteína CYP4G de *C. riparius*. Modelo realizado mediante I-TASSER, el cual presenta un valor C de -0,53.

Tabla IV. Proteínas moldes para la modelización de la proteína CYP4G de *C. riparius* mediante I-TASSER

Nº Acceso	Descripción	Identidad A*	Identidad B*	Superficie	Valor Z
1tqnA	<i>Human Microsomal P450 3A4</i>	23 %	23 %	83 %	3,10
1tqnA	<i>Human Microsomal P450 3A4</i>	23 %	23 %	83 %	2,69
1tqnA	<i>Human Microsomal P450 3A4</i>	23 %	23 %	83 %	4,27
1tqnA	<i>Human Microsomal P450 3A4</i>	23 %	23 %	83 %	4,67
1tqnA	<i>Human Microsomal P450 3A4</i>	23 %	23 %	83 %	3,01
2q9fA	<i>Human cytochrome P450 46A1</i>	23 %	21 %	76 %	3,03
4j14A	<i>Human cytochrome P450 CYP46A1</i>	23 %	21 %	77 %	3,64
3czhA	<i>CYP2R1</i>	22 %	21 %	81 %	1,66
3eqmA	<i>Human placental aromatase cytochrome P450</i>	20 %	19 %	79 %	5,02
1tqnA	<i>Human Microsomal P450 3A4</i>	23 %	23 %	83 %	6,56

* Identidad A indica la identidad de secuencia con respecto a los moldes en regiones específicas.
Identidad B indica la identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos completa.

Tabla V. Análogos estructurales identificados en la base de datos PDB con I-TASSER mediante TM-align

Nº Acceso	Descripción	TM	RMSD	Identities	Superficie
1tqnA	Human Microsomal P450 3A4	0,823	0,86	23,3	83,0
3na1A	Human CYP11A1	0,738	3,04	16,4	81,0
4k0fA	Lanosterol 14-alpha demethylase	0,735	3,21	15,9	81,8
3k9vA	Rat mitochondrial P450 24A1	0,732	2,96	16,9	80,3
3mzsA	Cytochrome P450 CYP11A1	0,731	3,14	16,5	80,7
2vn0A	CYP2C8DH	0,727	3,10	19,3	80,7
1n6bA	Microsomal Cytochrome P450 2C5/3LVdH	0,725	3,11	20,8	80,5
3dl9B	CYP2R1	0,725	3,11	21,6	80,7
1bu7B	Cytochrome P450BM-3 heme domain	0,722	2,99	17,4	79,4
3juvA	Human lanosterol 14alpha-demethylase	0,720	2,91	17,0	79,1

1.1.3. Localización cromosómica del gen *CYP4G*

La localización del gen *CYP4G* de *C. riparius* mediante hibridación *in situ* en cromosomas politénicos de glándulas salivales reveló una única banda localizada en la región II-A2 del brazo derecho del cromosoma II, sugiriendo su presencia en un solo *locus* (Figura 12).

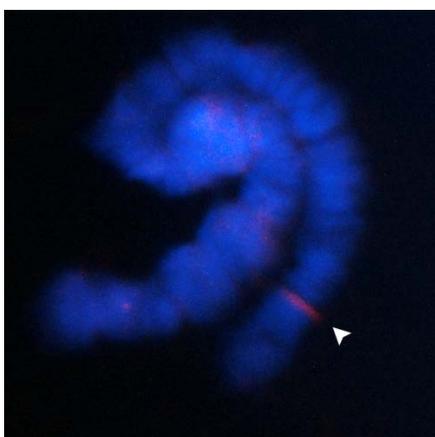


Figura 12. Localización del gen *CYP4G*. A partir de una sonda marcada con digoxigenina se detectó mediante FISH una única señal teñida en rojo con TRITC en la región II-A2 del brazo derecho del cromosoma II.

1.2. Caracterización molecular del gen de la *proteína de choque térmico de 27 kDa (hsp27)*

La presencia de compuestos tóxicos puede provocar la activación de la respuesta a estrés, permitiendo la adaptación del organismo a ambientes que pueden comprometer su supervivencia. Un factor clave es la inducción de las proteínas de choque térmico (HSPs), crítica para el mantenimiento de la homeostasis celular en situaciones de estrés, por lo que podrían ser útiles como posibles biomarcadores de este tipo de procesos. El conocimiento de las HSPs en *C. riparius* es muy limitado y está centrado principalmente en las proteínas HSPs de mayor tamaño, por lo que se planteó la secuenciación y caracterización molecular de un gen que codifica para una proteína de choque térmico de pequeño tamaño, la proteína de choque térmico de 27 kDa (HSP27).

1.2.1. Identificación y secuenciación del gen *hsp27*

Para la secuenciación del ARNm del gen *hsp27* de *C. riparius* se diseñó un oligonucleótido en una región con alta identidad de secuencia con respecto a otras especies de dípteros, tal y como se indica en el apartado 2.6.3.2 de materiales y métodos para su amplificación sobre ADNc. Posteriormente se diseñó un oligonucleótido sobre la secuencia obtenida del extremo 3' del ADNc para amplificar el fragmento del extremo 5' del ADNc y así completar su secuencia.

El ARNm tiene un tamaño de 1010 pb con un marco de lectura abierto de 588 pb, que codifica para una proteína de 195 aminoácidos con un peso molecular estimado de 22,8 kDa y un punto isoeléctrico de 6,17. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos se depositó en el *GenBank* bajo el número de acceso KC495957 (Figura 13). El ARNm incluye una región 5' no traducible de 107 pb, la cual es rica en adenosinas (53,3%), característica de los genes *hsps*. La región 3' no traducible, sin incluir la cola de poliA, consta de 293 pb y contiene tres posibles señales de poliadenilación (AATAA) localizadas entre las posiciones 822-827, 832-837 y 949-954 del ARNm, y un elemento ARE (*AU Rich Element*; ATTTA) entre las posiciones 793-797 del ARNm. La amplificación sobre ADN genómico no mostró la presencia de ningún intrón a lo largo de su secuencia.

El análisis de la secuencia de aminoácidos mediante BLAST en la base de datos de dominios conservados del NCBI mostró que esta proteína pertenece a la superfamilia α -cristalino/sHSPs, presentando un dominio α -cristalino entre los aminoácidos K₈₅ e I₁₅₈ (Figura 13). La HSP27 de *C. riparius* contiene una única cisteína en posición C₉₁, característica de la familia de las chaperonas en la que la presencia del aminoácido cisteína es mucho menor que en otras familias de proteínas (Fu y col., 2003).

La comparación de la secuencia de aminoácidos con las HSP27s de otros insectos previamente descritas mostró que la de *C. riparius* tiene una menor identidad de secuencia, presentando un 47 % de identidad con la HSP27 de *Ceratitis capitata*, un 45 % con la HSP27 de *Drosophila melanogaster* y un 48 % con la HSP25 de *Sarcophaga crassipalpis*. Por otra parte, la comparación de secuencias puso de manifiesto la presencia de tres regiones altamente conservadas y el dominio α -cristalino previamente indicado. Como se muestra en la figura 13, el primer dominio comprende desde el aminoácido M₁ hasta el I₁₁ presente en la región amino terminal, contiene aminoácidos hidrofóbicos y presenta un 29 % de identidad de secuencia con respecto a las tres especies mencionadas. El segundo dominio, situado entre los aminoácidos D₃₇ y N₄₉, presenta un 48 % de identidad de secuencia entre los cuatro homólogos de la HSP27, siendo este dominio específico de las proteínas HSP27s. El tercer dominio, localizado junto al extremo carboxi-terminal del dominio α -cristalino, incluye veintiocho aminoácidos comprendidos entre las posiciones K₁₅₉ y K₁₈₆ y muestra un 48 % de identidad de secuencia con *D. melanogaster*, *C. capitata* y *S. crassipalpis*. Este tercer dominio se encuentra en todas las sHSPs de *Drosophila* (Southgate y col., 1983) (Figura 13).

A

```

1   TTTATAAAAGAAATTTCAAAGTAAATAAACCAAAGGGAAATAAGGAAATCGAAAACCTAAGATTCAAAGTATAAT
76  TAAAAGCGTGAAAGTTTGAAGTAGCAAAAAATGTCATTAGTTCCTACTTTGTGGAGAGACATAGATGATTCT
1   M S L V P T L W R D I D D F
151 ACGCTAATCCATGGAGATTACAGCAGCATTTAATTCCTTCATGGCGACGACCAATGTCATTTTTTGCAGATTTCG
15  Y A N P W R L Q H D L I P S W R R P M S F F D D F
226 GATTTGGTTTCCATCCTCATGATCTTAACGAGATGCTGAGAATACCTCGTGAATTTAGACAATGGAAACACGTT
40  G F G F H P H D L N E M L R I P R E F R Q M E Q R
301 CGAGAGAATTGCAAAGACAAATGATGGGGGATATAAATGAGGTAATCCAACAACGGCAAGGATGGCTTCCAAG
65  S R E L Q R Q M M G D I N E V I P T T G K D G F Q
376 TGTGCATGGATGTTCAACAATTTAAACCAAGTGAATTTACTGTAAAGACAACCTGATAATTCGGTGGTTATTGAAG
90  V C M D V Q Q F K P S E I T V K T T D N S V V I E
451 GAAAACATGAAGAACGACAAGATGAGCATGGTCAAATCAGTCGTCATTTTATTCGACGCTATACACTTCTCAAAG
115 G K H E E R Q D E H G Q I S R H F I R R Y T L P K
526 GATATGACCCAAAATCAATAAGTCTGAATTATCTTCAGATGGGGTTCTGACTATCAAGGCACCTCCACCACAG
140 G Y D P K S I S S E L S S D G V L T I K A P P P Q
601 CTATTGAAAATAATGAGCGTGTAAATCAGCATTCAACACACAGGACCGGCTCGACTTAATGTTAAAGAAAATAAGC
165 A I E N N E R V I S I Q H T G P A R L N V K E N K
676 CAATTGAAGACAAAAGTAAATTCACATCCAAAAGATGTTTAAAGCACAGCATTTTATAAATCAAATCTGGACT
190 P I E D K K
751 TTTGGTTATTTTTTAGAATAGTTCAAAGACTCATGTCACAAAATTTATAATTTTTACCATAATTAATCACCAATA
826 AAGGATAATAAATAAGTATTTGTTCATACAAAAAAGTTTTACGTAGCAGTGTATAATAGAAAAAGAATTTTGT
901 AACTACCAAAGTGTAAATGATTACAATCTGAAAATGTGAATTAATTGAATAATGATTAGTTGGTTCTTAGGAT
976 GACCTTAAATTACAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

B

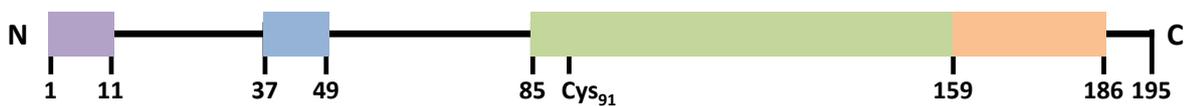


Figura 13. Secuencia del gen *hsp27* y mapa de las regiones conservadas de la proteína HSP27. (A) Secuencia de nucleótidos del gen *hsp27* y de aminoácidos de la proteína HSP27 de *C. riparius*. El gen contiene una región 5' no traducible de 107 pb y una región 3' no traducible de 293 pb, que contiene tres posibles sitios de poliadenilación AATAAA (rojo) y un elemento rico-AU o ARE con la secuencia ATTTA (negrita). (B) Representación esquemática de los dominios de la proteína HSP27. El dominio amino-terminal está indicado en morado, el dominio característico de las proteínas HSP27s en azul, el dominio α -cristalino en verde y el dominio carboxi-terminal en naranja.

1.2.2. Determinación de la estructura tridimensional de la proteína HSP27

Para la obtención de la estructura tridimensional del dominio α -cristalino de la proteína HSP27 se realizó la búsqueda de diferentes moldes empleando PSI-BLAST y HHblits mediante el programa Swiss-Model. En la tabla VI se muestran las proteínas moldes seleccionadas en función de la identidad, los espacios y el valor E de las comparaciones de secuencias, además del método y la resolución para la determinación de su estructura tridimensional. A continuación se construyeron los modelos a partir de las diferentes proteínas moldes, seleccionadas porque presentaban mayor identidad de secuencia, menor número de espacios en la secuencia, menor valor E y mayor resolución para la determinación de su estructura tridimensional (Tabla VI). Se seleccionó como proteína molde para la modelización de la estructura tridimensional del dominio α -cristalino la proteína 4m5s.1.A, ya que presenta el mayor valor QMEAN4 (Figura 14).

Tabla VI. Proteínas moldes empleadas en la modelización del dominio α -cristalino de la proteína HSP27 de *C. riparius* mediante Swiss-Model

Nº Acceso	Descripción	Dominio	Identities	Método	Espacios*	Valor E*	QMEAN4
4m5s.1.A	<i>Alpha-crystallin B chain</i>	α -cristalino	55,41 %	Rayos X 1,4 Å	0/74	1e-28	-0,37
3q9q.1.A	<i>Heat shock protein beta-1</i>	α -cristalino	57,53 %	Rayos X 2,2 Å	0/73	9e-30	-0,81
4mjh.1.B	<i>Heat shock protein beta-1</i>	α -cristalino	60,27 %	Rayos X 2,6 Å	0/73	4e-31	-0,85
4mjh.1.A	<i>Heat shock protein beta-1</i>	α -cristalino	60,27 %	Rayos X 2,6 Å	0/73	3e-31	-1,13
2wj7.2.A	<i>Alpha-crystallin B chain</i>	α -cristalino	55,41 %	Rayos X 2,6 Å	0/74	1e-28	-2,88

* Parámetros calculados mediante BLAST

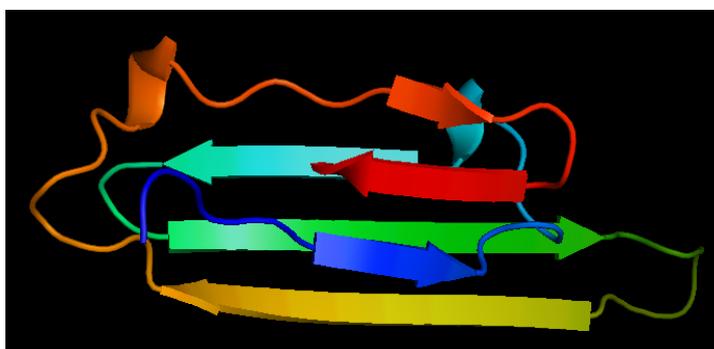


Figura 14. Modelo tridimensional del dominio α -cristalino de la proteína HSP27 de *C. riparius*. A partir del modelo obtenido del dominio α -cristalino de la proteína HSP27, se puede establecer la presencia de seis láminas- β y de dos pequeñas α -hélices.

De acuerdo con el modelo obtenido (Figura 14), el dominio α -cristalino de la proteína HSP27 consta de seis láminas- β , situadas entre los aminoácidos 87-93, 102-107, 110-122, 125-136, 147-150 y 155-158, y de dos α -hélices, localizadas entre los aminoácidos 99-101 y 138-140.

1.2.3. Localización cromosómica del gen *hsp27*

La localización del gen *hsp27* por hibridación *in situ* sobre cromosomas politénicos mostró que se encuentra localizado en un único *locus* en la región I-C4 del brazo derecho del cromosoma I de *C. riparius* (Figura 15).

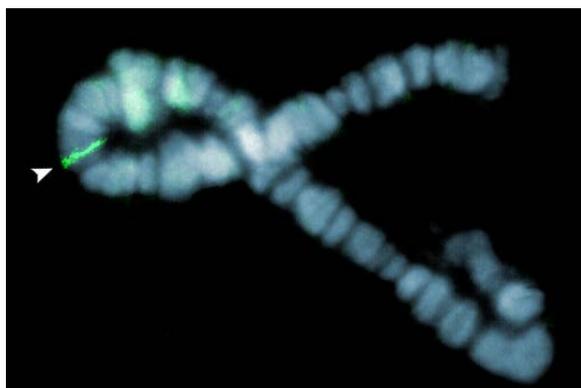


Figura 15. Localización del gen *hsp27*. A partir de una sonda marcada con digoxigenina se detectó mediante FISH una única señal teñida en verde con FITC en la región I-C4 del brazo derecho del cromosoma I.

1.3. Caracterización molecular del gen del receptor hormonal de ecdisona (*EcR*)

El gen del *receptor hormonal de la ecdisona (EcR)* codifica para una proteína que forma parte del receptor de la ecdisona, hormona que controla junto con la hormona juvenil el paso entre los diferentes estadios larvarios y la muda o metamorfosis, por lo que esta ruta es vital para el desarrollo y supervivencia de insectos. En este estudio se planteó secuenciar y caracterizar el gen *EcR* para su posterior uso en el análisis de los efectos tóxicos del NP, TCS y BPA.

1.3.1. Identificación y secuenciación del gen *EcR*

A partir de la secuencia de un fragmento de 240 pb previamente obtenido en nuestro laboratorio (Planelló y col., 2008) y de regiones conservadas de esta proteína en otros insectos se diseñaron oligonucleótidos tal y como se indica en el apartado 2.6.2 de materiales y métodos para la obtención de la secuencia de nucleótidos del gen *EcR*.

Los resultados de la secuenciación con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos mostraron que la región traducible presenta un tamaño de 1620 pb que codifican para una proteína de 539 aminoácidos con un peso molecular estimado de 61,4 kDa y un punto isoeléctrico de 5,89.

A continuación, con los oligonucleótidos diseñados previamente para la amplificación del ADNc del gen *EcR*, se realizó una amplificación sobre ADN genómico para determinar si la secuencia de nucleótidos presentaba intrones. Tras comparar la secuencia del ARNm con la obtenida sobre ADN genómico mediante el programa ClustalW a través del ICBP (*Institut de Biologie et Chimie des Protéines*) se identificaron cuatro intrones de 66, 70, 80 y 66 pb en el ADN genómico, localizados entre las posiciones 119-120, 410-411, 928-929 y 1081-1082 del ARNm respectivamente (Figura 16). La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos se incorporó a la base de datos del *GenBank* con el número de acceso KJ135024 (Figura 16).

La comparación de la proteína EcR de *C. riparius* con las secuencias conocidas en otros insectos presentes en las bases de datos y con otros miembros de la superfamilia de los receptores de esteroides mostró que comparte dos dominios altamente conservados y característicos de los miembros de la superfamilia de los receptores de esteroides (Evans, 1988; Green y Chambon, 1988). Estos dominios son el dominio C, o dominio de unión al ADN, y el dominio E, o dominio de unión a hormona (Krust y col., 1986) (Figura 16). Otros tres dominios característicos de la proteína EcR son el dominio A/B, el dominio D y el dominio F (Figura 16). El dominio C presenta la estructura característica de dedo de Zinc, cuyas cisteínas implicadas en la coordinación con el átomo de Zinc se encuentran conservadas con la secuencia consenso característica de dominio de unión a ADN de las hormonas nucleares (C-X₂-C-X₁₃-C-X₂-C-X₁₅-C-X₅-C-X₉-C-X₂-C) (Borden y Freemont, 1996). Las cisteínas presentes en la estructura del dedo de Zinc se encuentran conservadas en todos los receptores de la ecdisona comparados excepto en *Plodia interpunctella*, en la que la C₃₆₂ de *C. riparius* se sustituye por el aminoácido tirosina. Este dominio presenta dos regiones características: la caja P (E₁₃₃-G₁₃₇), totalmente idéntica respecto a otros miembros del EcR comparados, y la caja D (K₁₅₂-E₁₅₆), cuyo porcentaje de identidad varía respecto a otras especies. Ambas son importantes para el reconocimiento específico del elemento de respuesta a hormonas (Umesono y Evans, 1989). Por otro lado, el dominio D presenta dos heptapéptidos característicos que actúan como señal de localización nuclear (I₁₉₃-K₁₉₉; Q₂₀₁-V₂₀₇) (Kalderon y col., 1984), presente en otros EcR estudiados como en *Ceratitis capitata* (Verras y col., 1999), *Lucilia cuprina* (Hannan y Hill, 1997) y *Aedes aegypti* (Cho y col., 1995) (Figura 16). Por último, el dominio E presenta un motivo cremallera hélice-giro (Q₃₃₅-D₃₇₆) conservado en todos los receptores esteroideos, tiroideos, del ácido retinoico y de la vitamina D3, en el receptor activado por el proliferador de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor*, PPAR) y en el receptor de retinoide X (*retinoid-X receptor*, RXR) (Maksymowych y col., 1992) (Figura 16). Este motivo se ha observado también en *Ceratitis capitata* (Verras y col., 1999) y *Lucilia cuprina* (Hannan y Hill, 1997) y presenta cinco aminoácidos que contribuyen a la heterodimerización (V₃₃₈, Q₃₅₂, L₃₅₉, V₃₆₆, y R₃₇₃).

1.3.2. Determinación de la estructura tridimensional de la proteína EcR

La obtención de la estructura tridimensional de la proteína EcR de *C. riparius* se realizó empleando el programa Swiss-Model. Para ello, inicialmente se llevó a cabo la búsqueda de diferentes proteínas moldes para el dominio C y el dominio E mediante PSI-BLAST y HHblits a través de Swiss-Model. Las proteínas moldes para cada uno de los dominios se seleccionaron en función de la identidad, los espacios de secuencia, el valor E de las comparaciones de secuencias y del método y la resolución para la determinación de la estructura tridimensional (Tabla VII). A continuación se realizaron diferentes modelos a partir de estas proteínas moldes, seleccionándose para la modelización del dominio C y del dominio E como mejores proteínas moldes 2han.1.D y 2r40.1.A, respectivamente, ya que proporcionaban el mayor valor de QMEAN4 (Figura 17).

Tabla VII. Proteínas moldes para la modelización del dominio C y del dominio E de la proteína EcR de *C. riparius* mediante Swiss-Model

Nº Acceso	Descripción	Dominio	Identities	Método	Espacios*	Valor E*	QMEAN4
2han.1.D	<i>Ecdysone receptor</i>	Dominio C	95,45 %	Rayos X 2,0 Å	0/66	2e-45	-1,34
1r0o.1.D	<i>Ecdysone receptor</i>	Dominio C	95,45 %	Rayos X 2,2 Å	0/66	2e-45	-1,66
1r0n.1.D	<i>Ecdysone receptor</i>	Dominio C	95,45 %	Rayos X 2,6 Å	0/66	3e-55	-2,22
2r40.1.A	<i>Ecdysone receptor</i>	Dominio E	67,66 %	Rayos X 2,4 Å	1/224	2e-111	-1,57
1r1k.1.A	<i>Ecdysone receptor</i>	Dominio E	67,66 %	Rayos X 2,9 Å	1/224	2e-111	-3,42
3ixp.1.B	<i>Ecdysone receptor</i>	Dominio E	66,81 %	Rayos X 2,8 Å	1/224	4e-110	-3,82

* Parámetros calculados mediante BLAST

Como puede observarse en la figura 17 el dominio C de la proteína EcR consta de dos láminas- β , situadas entre los aminoácidos 124-126 y 129-131, y de tres α -hélices localizadas entre las posiciones 133-144, 163-165 y 168-177. Por otro lado, el dominio E está formado por tres láminas- β , presentes entre las posiciones 375-376, 381-383 y 389-390, y por once α -hélices entre los residuos 293-295, 301-308, 321-343, 347-349, 352-372, 392-397, 401-415, 421-432, 442-463, 470-500 y 507-512.

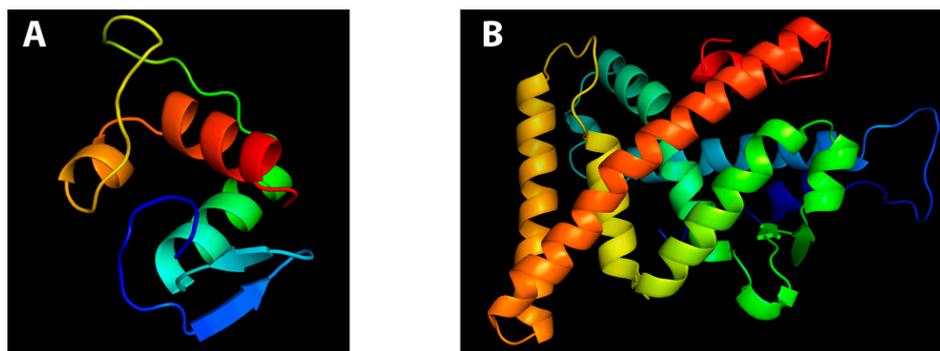


Figura 17. Modelo tridimensional del dominio C (A) y del dominio E (B) de la proteína EcR de *C. riparius*. De acuerdo con los modelos obtenidos mediante Swiss-Model, el dominio C consta de dos láminas- β y tres α -hélices, mientras que el dominio E presenta tres láminas- β y once α -hélices.

1.4. Identificación del gen *E74* de respuesta temprana a ecdisona

Para continuar con el estudio de genes implicados en la ruta de la ecdisona se planteó la identificación del gen *E74* de *C. riparius*, que codifica para un factor de transcripción de respuesta temprana a la ecdisona. Para ello se diseñó una pareja de oligonucleótidos a partir de regiones homólogas identificadas tras la comparación de secuencias del gen *E74* de diferentes especies de insectos, que amplificó un fragmento de 162 pb mediante RT-PCR (Figura 18). El producto de PCR se secuenció y se realizó una búsqueda mediante BLAST para confirmar la homología del fragmento amplificado con el gen *E74* de otras especies de insectos cuyas secuencias se encontraban en la base de datos del *GenBank*. El fragmento amplificado resultó suficiente para los posteriores análisis de actividad transcripcional que se plantearon como objetivo en esta tesis.

```

1   GGGTTCACCACTATCTGTGGGAATCTTACTGAACTTCTTCAAGATCGTGAATATTGTCCACGATTCATCAA
1   G S T T Y L W E F L L K L L Q D R E Y C P R F I K
76  ATGGACAAATCGTGATAAGGGAATCTTCAAGCTCGTCGATTCCAAAGCTGTCTCAAAGCTGTGGGGCATGCACAA
26  W T N R D K G I F K L V D S K A V S K L W G M H K
151 GAACAAGCCGGA
51  N K P
    
```

Figura 18. Secuencia de un fragmento del gen y de la proteína E74. Secuencia de nucleótidos del gen *E74* de *Chironomus riparius* y su secuencia de aminoácidos deducida que codifica para la proteína E74.

2. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL NONILFENOL, TRICLOSÁN Y BISFENOL A SOBRE LARVAS DE *Chironomus riparius*

El objetivo de este trabajo es estudiar los efectos que producen los compuestos químicos nonilfenol (NP), triclosán (TCS) y bisfenol A (BPA) sobre larvas de cuarto estadio de *Chironomus riparius* para identificar posibles biomarcadores implicados en diferentes rutas celulares para su uso en estudios de ecotoxicología. Para ello se analizó inicialmente la supervivencia frente a cada compuesto sobre

poblaciones de laboratorio de *C. riparius* bajo condiciones estandarizadas de crecimiento (USEPA, 2000; OCDE, 2004). Las concentraciones iniciales de exposición se seleccionaron teniendo en cuenta estudios previos realizados con estos compuestos sobre quironómidos y otros organismos.

Una vez elegidos los tratamientos se seleccionaron los parámetros celulares a estudiar. El estudio combinó el análisis de la expresión de diferentes genes, relacionados con diferentes procesos celulares susceptibles a la presencia de xenobióticos, la evaluación de una actividad enzimática implicada en la ruta de eliminación de tóxicos y la caracterización genotóxica de cada compuesto, ya que se ha sugerido que pueden producir daño en el ADN.

2.1. Efectos del nonilfenol sobre larvas de *Chironomus riparius*

Estudios previos han demostrado la capacidad del nonilfenol (NP) de mimetizar a la hormona 17 β -estradiol en mamíferos (Soares y col., 2008) así como su capacidad de afectar a la morfología de los testículos y a la fertilidad en peces macho (Lavado y col., 2004). En quironómidos se ha observado que tiene efectos sobre la reproducción y el desarrollo (Meregalli y col., 2001; Bettinetti y Provini, 2002; Lee y Choi, 2006) pero la información sobre la acción que ejerce a nivel molecular es escasa. Por ello, con la finalidad de buscar nuevos biomarcadores a nivel molecular y celular de los efectos del NP, se decidió evaluar la capacidad disruptora endocrina de este compuesto xenobiótico sobre larvas de cuarto estadio de *C. riparius* estudiando genes implicados en la ruta hormonal de la ecdisona y cómo afecta este compuesto a la respuesta a estrés y al sistema de detoxificación celular. Por último, también se evaluó su potencial genotóxico.

2.1.1. Análisis de la toxicidad del nonilfenol

La toxicidad del NP se estudió inicialmente en poblaciones de laboratorio de *C. riparius* realizando un análisis de la supervivencia de las larvas frente a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. El rango de concentraciones empleado se seleccionó teniendo en cuenta estudios previos en quironómidos y otros organismos, así como estudios *in vitro* sobre cultivos celulares (Kahl y col., 1997; Ha y Choi, 2008a, 2008b; Han y col., 2010; Park y col., 2010), las cuales estaban comprendidas dentro de un rango de concentraciones similares a las halladas en el medio ambiente (Blackburn y Waldock, 1995; Hale y col., 2000). Las larvas de *C. riparius* se expusieron a NP en un rango de concentraciones comprendido entre 1 $\mu\text{g/L}$ y 10000 $\mu\text{g/L}$, analizándose la supervivencia en intervalos de 24 horas hasta un total de 96 horas.

Los resultados obtenidos muestran que el efecto del NP sobre la supervivencia de larvas es dependiente de la concentración y el tiempo (Figura 19). Cuando las larvas se expusieron a

concentraciones de 1000 $\mu\text{g/L}$ y 10000 $\mu\text{g/L}$ de NP se observó una disminución significativa de la supervivencia a partir de las 72 horas y de las 48 horas respectivamente. En cambio, a concentraciones menores no se produjo una alteración significativa en la supervivencia a los tiempos estudiados respecto a lo observado en larvas no tratadas con el xenobiótico.

El análisis de los datos de supervivencia mediante el modelo DEB (*Dynamic Energy Budget Model*) mostró que la concentración letal media (LC50) del NP es dependiente del tiempo de exposición (Tabla VIII), al igual que sucedió con el tiempo letal medio (LT50), el cual es dependiente de la concentración de exposición de NP (Tabla IX).

A partir de estos resultados se seleccionaron como concentraciones de trabajo 1, 10 y 100 $\mu\text{g/L}$ de NP para llevar a cabo los ensayos experimentales, ya que no hubo diferencia del porcentaje de supervivencia entre las larvas tratadas y sin tratar a dichas concentraciones. Además, estas concentraciones se encontraban por debajo del valor LC50 para cada uno de los tiempos estudiados, asegurando así la supervivencia de las larvas durante los experimentos a realizar.

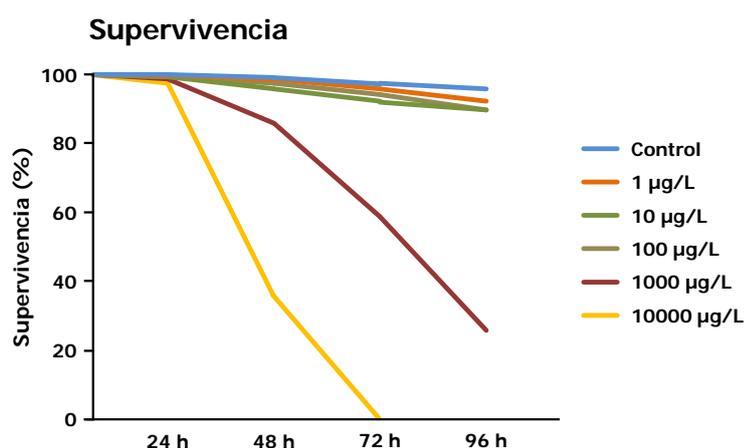


Figura 19. Curva de supervivencia del NP. Efecto de la exposición a 1, 10, 100, 1000 y 10000 $\mu\text{g/L}$ de NP sobre la supervivencia de larvas de cuarto estadio de *C. riparius* hasta 96 horas de exposición.

Tabla VIII. Valores LC50 del NP

Tiempo	LC50
24 horas	19400 $\mu\text{g/L}$
48 horas	4880 $\mu\text{g/L}$
72 horas	2200 $\mu\text{g/L}$
96 horas	1260 $\mu\text{g/L}$

Tabla IX. Valores LT50 del NP

Concentración	LT50
1 $\mu\text{g/L}$	-
10 $\mu\text{g/L}$	-
100 $\mu\text{g/L}$	369 h
1000 $\mu\text{g/L}$	108 h
10000 $\mu\text{g/L}$	33,4 h

2.1.2. Efectos del nonilfenol sobre la expresión de genes relacionados con el sistema endocrino

La ruta hormonal de respuesta a la ecdisona regula el desarrollo y la muda de los insectos, siendo una de las principales rutas endocrinas de estos organismos. Cambios en los patrones de expresión en genes implicados en esta ruta podrían indicar que el nonilfenol actúa como disruptor endocrino en esta especie. Para estudiar esta posibilidad se seleccionó el gen *EcR*, que codifica para uno de los componentes del heterodímero del receptor de la ecdisona. Además de este gen se incluyó también el gen *ERR*, un receptor hormonal nuclear huérfano cuyo ligando endógeno es desconocido, aunque se piensa que puede estar implicado en procesos de regulación endocrina.

El análisis de los niveles de expresión del ARNm de los genes seleccionados se llevó a cabo por medio de RT-PCR en tiempo real con larvas de *C. riparius* expuestas a las concentraciones de 1, 10 y 100 µg/L durante 24 y 96 horas. Los resultados obtenidos mostraron que la presencia del NP redujo los niveles de expresión tanto del gen *EcR* como del gen *ERR* tras 24 horas de exposición, siendo esta disminución estadísticamente significativa a la concentración de 100 µg/L (Figura 20). Sin embargo, en exposiciones de 96 horas los niveles de expresión eran similares, e incluso ligeramente superiores, a los observados en las larvas no expuestas a NP, lo que indica una recuperación de los niveles de expresión de los genes *EcR* y *ERR* tras exposiciones largas.

En conjunto estos datos sugieren que el NP produce un efecto muy parecido sobre los dos genes de receptores nucleares analizados, produciendo una inhibición de forma transitoria en la respuesta endocrina de larvas de *C. riparius*.

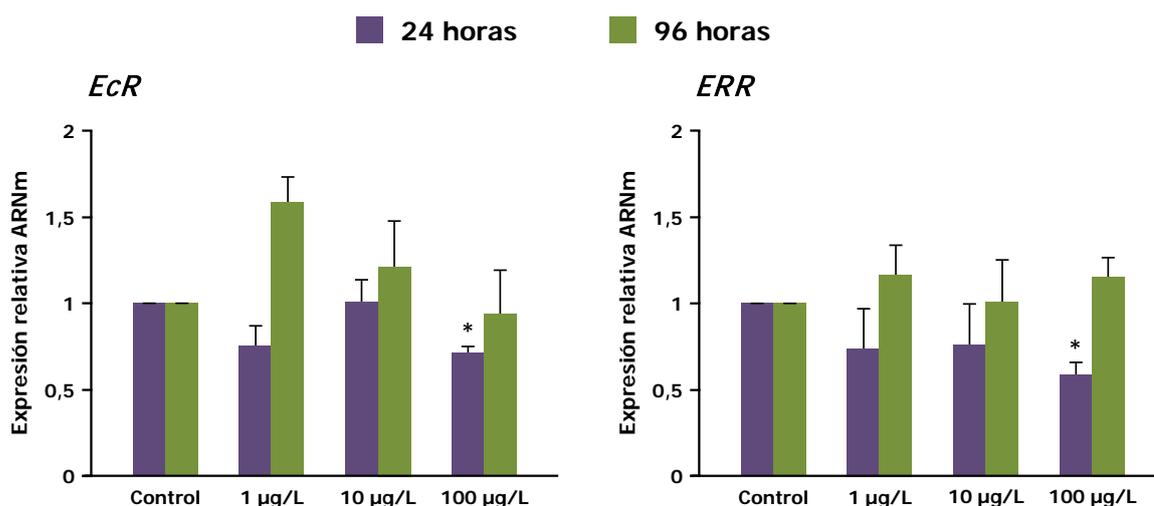


Figura 20. Efectos del NP sobre genes de la ruta endocrina. Análisis de expresión del ARNm de los genes *EcR* y *ERR* de larvas de *C. riparius* expuestas a 1, 10 y 100 µg/L de NP durante 24 y 96 horas. Los datos muestran los valores medios de expresión de larvas tratadas con respecto a los grupos de larvas control. Las barras de error representan el error estándar de la media. Diferencias significativas: * $p \leq 0,05$.

2.1.3. Efectos del nonilfenol en la respuesta a estrés celular

Los compuestos tóxicos pueden producir situaciones de estrés en organismos expuestos a ellos, desencadenando así la respuesta a estrés celular. El efecto se manifiesta en la alteración de la expresión de los genes de estrés, especialmente los que codifican para proteínas de choque térmico, que son las más representativas de esta respuesta. Estudios previos han descrito la capacidad del NP de inducir la expresión del gen que codifica para la HSP70 a tiempos cortos de exposición (Lee y Choi, 2006) y su sensibilidad frente a un amplio rango de situaciones de estrés medioambiental, entre los que se encuentran el aumento de temperatura y la presencia de compuestos químicos. Estos antecedentes apoyan el interés que tiene el análisis del gen *hsp70* como potencial biomarcador de estrés ambiental producido por compuestos xenobióticos.

Por otro lado, se analizó la respuesta del gen *hsp27* como representante de las proteínas de choque térmico de pequeño tamaño (sHSPs). Las sHSPs constituyen el grupo más diverso y menos conservado dentro de la familia de las HSPs, aunque juegan un papel crucial en la respuesta celular frente a contaminantes ambientales; también están implicadas en importantes procesos biológicos, tales como el crecimiento celular, la apoptosis, la diferenciación, la diapausa, la fluidez de la membrana o la resistencia a la inanición.

El análisis del efecto del NP sobre los niveles del ARNm del gen *hsp70*, presentado en la figura 21, mostró que después de 24 horas de exposición los niveles eran similares a los de larvas no tratadas, excepto en el caso de la concentración más alta, en la que se produjo una inhibición de la expresión, en contra a lo descrito previamente (Lee y Choi, 2006). En cambio, cuando se estudió el efecto a tiempos largos, con exposiciones de 96 horas, se produjo una reducción de la expresión a todas las concentraciones estudiadas (Figura 21).

Por otra parte, el estudio de la expresión del gen *hsp27* después de 24 horas de exposición a NP parece producir un incremento de los niveles del ARNm a las concentraciones más altas estudiadas, pero el análisis estadístico mostró que estos cambios no eran significativos (Figura 21).

De acuerdo con los datos obtenidos, se puede decir que el NP altera la respuesta a estrés celular inhibiendo por un lado la expresión del gen *hsp70*, mientras que provoca una ligera inducción de la expresión del gen *hsp27*. De esta forma, su efecto sobre las proteínas de choque térmico parece ser diferente y, por tanto, actuar a través de diversos mecanismos sobre la capacidad de la célula de responder a los cambios de su entorno.

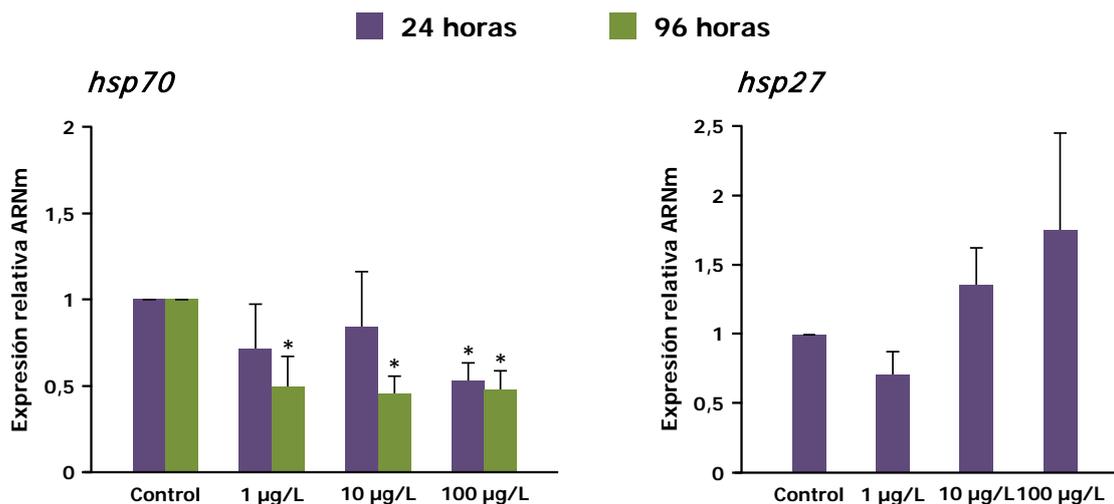


Figura 21. Efectos del NP sobre genes de la respuesta a estrés celular. Análisis de expresión del ARNm de los genes *hsp70* y *hsp27* de larvas de *C. riparius* expuestas a 1, 10 y 100 µg/L de NP durante diferentes tiempos. Las gráficas representan los valores medios de la expresión y el error estándar de la media respecto al grupo control. Diferencias significativas: * $p \leq 0,05$.

2.1.4. Efectos del nonilfenol sobre el sistema de detoxificación celular

La eliminación y neutralización de sustancias químicas extrañas del organismo se lleva a cabo a través de un mecanismo de defensa que implica diversas enzimas, evitando así su acumulación una vez que los compuestos xenobióticos han accedido al organismo.

Para conocer cómo reacciona el sistema de detoxificación ante la presencia del NP se planteó evaluar las dos fases del proceso de detoxificación celular a través del análisis de los niveles de expresión del gen *CYP4G*, perteneciente a la fase I, y del estudio la actividad enzimática de la GST, implicada en la fase II.

En la figura 22 se muestra el resultado de la cuantificación y análisis estadístico de los niveles de expresión del gen *CYP4G*. En ella puede observarse que tras la exposición de larvas de cuarto estadio de *C. riparius* durante 24 horas a 1, 10 y 100 µg/L de NP se produjo un descenso en los niveles del ARNm del gen *CYP4G*, el cual no se mantiene después de 96 horas de exposición, tiempo en el que los niveles de expresión alcanzaron de nuevo los valores de la muestra control.

Resultados similares se obtuvieron tras el estudio de la actividad enzimática de la GST. Como se muestra en la figura 22, se produjo un descenso de actividad a las concentraciones de 10 y 100 µg/L de NP a las 24 horas de exposición, mientras que tras exposiciones de 96 horas se recuperaron los niveles similares a los encontrados en larvas control.

Estos resultados apoyan la existencia de una respuesta conjunta de las dos fases del sistema de detoxificación a la presencia del NP, con una reducción de ambas tras 24 horas de exposición, mientras que a las 96 horas hay una recuperación de los niveles de expresión del ARNm del gen *CYP4G* y de la actividad enzimática de la GST. Al contrario de lo que sería esperable, un aumento de la actividad de estos mecanismos de detoxificación, se produjo un descenso de la actividad de los mecanismos de detoxificación, por lo que es posible que el NP no esté siendo metabolizado o, en su defecto, que esté siendo procesado por otras enzimas que forman parte del proceso de detoxificación.

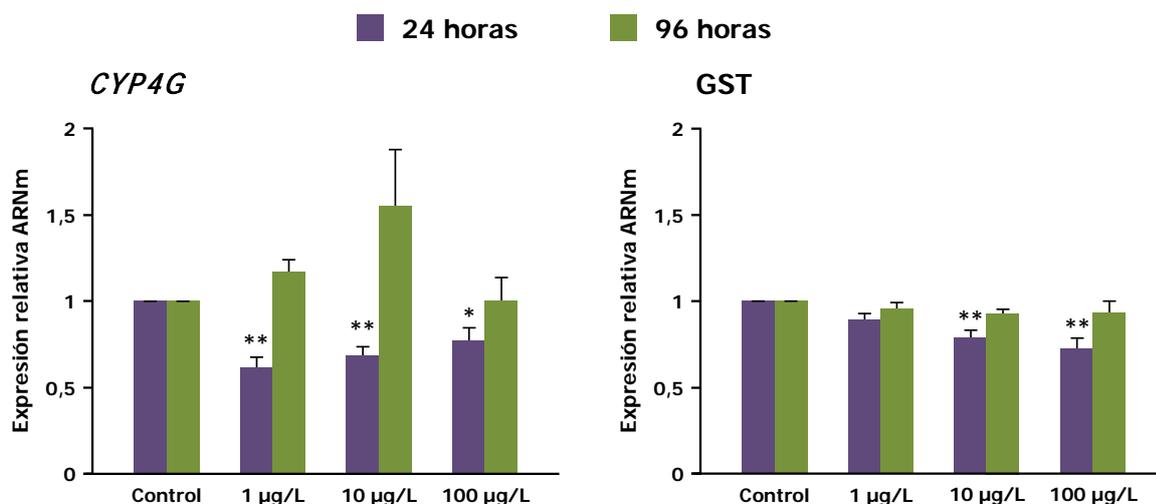


Figura 22. Efectos del NP sobre el sistema de detoxificación celular. Análisis de expresión del ARNm del gen *CYP4G* y de la actividad enzimática de la GST de larvas de *C. riparius* expuestas a 1, 10 y 100 µg/L de NP durante diferentes tiempos. Los datos representan los valores medios junto con el error estándar de la media respecto a los valores del control. Diferencias significativas: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

2.1.5. Evaluación de la genotoxicidad del nonilfenol

La genotoxicidad es uno de los parámetros de evaluación más importantes en los ensayos de toxicidad de compuestos químicos y en su valoración de riesgo ambiental. El daño en el ADN produce inestabilidad genómica y se ha sugerido que juega un papel importante en el descenso de la salud de la población.

El método seleccionado para evaluar los efectos genotóxicos que produce el nonilfenol sobre el ADN en larvas de *C. riparius* fue el ensayo cometa en condiciones alcalinas. Los parámetros elegidos para evaluar el daño genotóxico fueron el porcentaje de ADN en cola, la longitud de la cola, el momento cola y el momento oliva, ya que son considerados como los más representativos.

Como puede observarse en la figura 23, en la que se representa el daño en el ADN mediante momento oliva, el nonilfenol produjo un efecto genotóxico dependiente de concentración tanto a 24 como a 96 horas de exposición. Sin embargo, el daño producido es mayor a las 24 horas de exposición que a las 96 horas. La comparación entre los datos obtenidos a 24 horas con respecto a los de 96 horas permitió ver que a las concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g/L}$ hubo una disminución significativa en el daño en el ADN a largo plazo, mientras que a la concentración más baja estudiada no existían diferencias entre ambos tiempos de exposición. El análisis de la longitud de la cola, el porcentaje de ADN en cola y del momento cola (Tabla X) mostró los mismos resultados que el análisis del momento oliva, es decir, el NP produce daño en el ADN sobre larvas de *C. riparius* a todas las concentraciones y tiempos estudiados. Sin embargo, un hecho a destacar fue el incremento significativo en la longitud de la cola y el momento cola tras 96 horas de exposición a 1 $\mu\text{g/L}$, lo que indica que el tamaño del fragmento de ADN más pequeño producido por el NP disminuyó al aumentar el tiempo de exposición.

Mediante el ensayo cometa se demostró que el NP tiene actividad genotóxica a todas las concentraciones y tiempos estudiados, manifestándose de manera rápida a las 24 horas mientras que a las 96 horas hubo menor daño genotóxico, sugiriendo que la célula contrarresta esta acción mediante algún mecanismo de reparación.

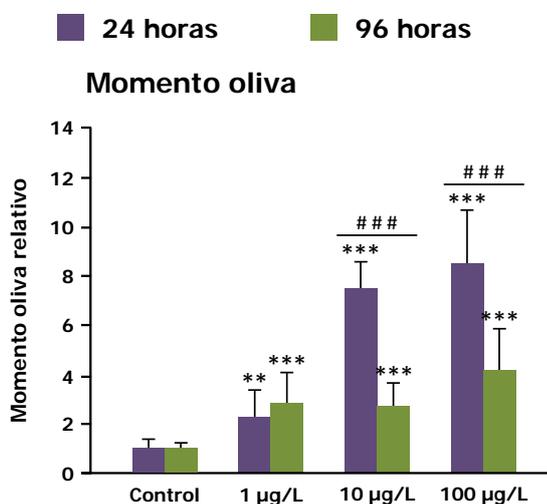


Figura 23. Daño en el ADN representado mediante el momento oliva. Análisis del daño genotóxico en el ADN de larvas de *C. riparius* expuestas a 1, 10 y 100 $\mu\text{g/L}$ de NP durante 24 y 96 horas expresado mediante el momento oliva. Los valores representan la media y el error estándar de la media respecto a los valores del grupo control. Diferencias significativas respecto al control: ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Diferencias significativas entre los tratamientos de 24 y 96 horas: ### $p \leq 0,001$.

Tabla X. Efectos genotóxicos del NP sobre larvas de *C. riparius* medidos mediante diferentes parámetros del ensayo cometa. Los datos representan los valores medios junto al error estándar de la media referidos al valor del control. Diferencias significativas respecto al control: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Diferencias significativas entre los tratamientos de 24 y 96 horas: ^b $p \leq 0,01$; ^c $p \leq 0,001$.

Tiempo	Concentración	Longitud cola	% ADN en cola	Momento oliva	Momento cola
24 horas	Control	1,00 ± 0,38	1,00 ± 0,28	1,00 ± 0,35	1,00 ± 0,57
	1 µg/L	2,12 ± 0,77 ***	1,80 ± 0,57 ***	2,28 ± 1,12 **	4,07 ± 2,66 *
	10 µg/L	6,71 ± 0,72 ***	3,18 ± 0,37 ***	7,49 ± 1,09 ***	17,72 ± 3,27 ***
	100 µg/L	6,50 ± 1,34 ***	3,52 ± 0,58 ***	8,51 ± 2,15 ***	20,13 ± 6,44 ***
96 horas	Control	1,00 ± 0,27	1,00 ± 0,20	1,00 ± 0,23	1,00 ± 0,39
	1 µg/L	3,01 ± 1,07 *** ^b	2,08 ± 0,56 ***	2,88 ± 1,21 ***	7,06 ± 4,26 *** ^b
	10 µg/L	2,97 ± 0,81 *** ^c	2,20 ± 0,52 *** ^c	2,76 ± 0,90 *** ^c	6,83 ± 3,25 ** ^c
	100 µg/L	4,00 ± 1,34 *** ^c	2,76 ± 0,63 *** ^c	4,17 ± 1,69 *** ^c	11,93 ± 6,30 ** ^c

El nonilfenol produjo un descenso de la expresión de los genes *EcR* y *ERR* después de 24 horas de exposición, aunque a las 96 horas se recuperaron los niveles observados en larvas control. Por otro lado, disminuyeron los niveles del ARNm del gen *hsp70* a todas las concentraciones estudiadas después de 24 horas de exposición, aunque el descenso solo fue estadísticamente significativo a la concentración de 100 µg/L de NP, mientras que a 96 horas este descenso se observó en todas las concentraciones estudiadas. En cambio el gen *hsp27*, que codifica para una sHSP, mostró una tendencia a incrementar sus niveles del ARNm, aunque no estadísticamente significativo.

El estudio del sistema de detoxificación puso de manifiesto que ambas fases del proceso se comportan, aparentemente, de forma similar. Tras 24 horas de exposición los niveles de expresión del ARNm del gen *CYP4G* y de la actividad de la GST descendieron a todas las concentraciones estudiadas, recuperándose los niveles de las larvas control a las 96 horas de exposición.

Finalmente, el NP produjo daño genotóxico en el ADN de *C. riparius* a todas las concentraciones y tiempos estudiados, con un mayor efecto a las 24 horas de exposición, que se redujo a las 96 horas de tratamiento.

2.2. Efectos del triclosán sobre larvas de *Chironomus riparius*

El triclosán (TCS) es un compuesto del que se dispone de poca información respecto a su interacción con los seres vivos. Resultados previos sugieren que el TCS altera el sistema hormonal tiroideo de mamíferos, actuando así como un compuesto disruptor endocrino. Debido a esto, y ante la falta de estudios sobre el modo de acción de este xenobiótico en invertebrados, se decidió estudiar los

efectos que éste ejerce sobre el sistema endocrino, la respuesta a estrés y el sistema de detoxificación de *C. riparius* así como su potencial genotóxico. Por tanto, se pretende conocer mejor su acción a nivel celular y valorar la posibilidad de que alguno de los parámetros estudiados pueda servir como biomarcador para este compuesto.

2.2.1. Análisis de la toxicidad del triclosán

El primer paso para la evaluación de la toxicidad del TCS fue el análisis de supervivencia de larvas de *C. riparius* expuestas a este compuesto. Las concentraciones se seleccionaron de acuerdo con los resultados de estudios previos en otros organismos y sobre cultivos celulares (Dussault y col., 2008; Raut y Angus, 2010; Hinthner y col., 2011; Cherednichenko y col., 2012; Gaume y col., 2012; Perron y col., 2012) y con el criterio de la similitud a concentraciones detectadas en el medio ambiente (Heidler y Halden, 2007; Nakada y col., 2010). El rango de concentraciones al que se expusieron las larvas de cuarto estadio de *C. riparius* estuvo comprendido entre 1 y 10000 µg/L. Para el estudio de supervivencia se contaron el número de larvas vivas cada 24 horas hasta las 96 horas de exposición.

En la figura 24 se muestra la curva de supervivencia de las larvas tras las exposiciones con TCS durante 96 horas. En ella puede observarse que el porcentaje de supervivencia depende de la concentración y el tiempo, produciéndose la muerte de todas las larvas expuestas a 10000 µg/L después de 24 horas de tratamiento. El resto de las concentraciones no afectaron a la supervivencia de las larvas en las primeras 48 horas de exposición, mientras que se produjo un descenso estadísticamente significativo a partir de las 72 horas de exposición en las concentraciones superiores a 10 µg/L.

Empleando el programa informático DEBtox se analizaron los datos de supervivencia siguiendo el modelo DEB (Tabla XI y Tabla XII). Como puede observarse, existe una relación entre los valores LC50 del TCS y el tiempo de exposición, al igual que ocurre con los valores LT50, los cuales son dependientes de la concentración. A partir de estos resultados se seleccionaron las concentraciones para los estudios a nivel molecular y celular, las cuales estaban dentro de un rango inferior a la concentración del valor LC50 para los tiempos estudiados.

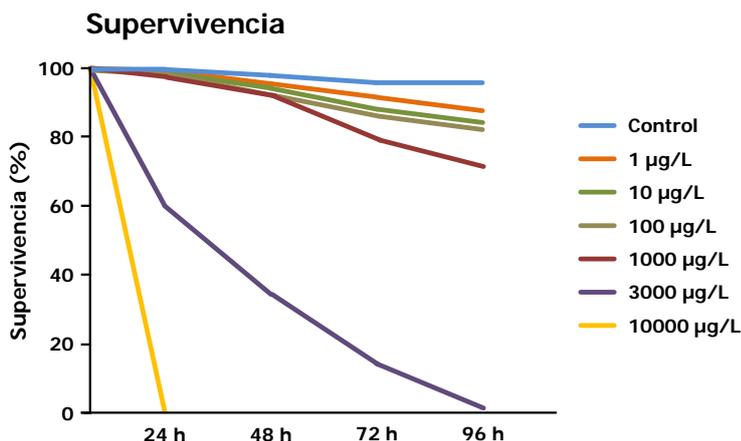


Figura 24. Curva de supervivencia del TCS. Efecto de la exposición a 1, 10, 100, 1000 y 10000 µg/L de TCS sobre la supervivencia de larvas de cuarto estadio de *C. riparius* hasta 96 horas de exposición.

Tabla XI. Valores LC50 del TCS

Tiempo	LC50
24 horas	4040 µg/L
48 horas	2070 µg/L
72 horas	1580 µg/L
96 horas	1370 µg/L

Tabla XII. Valores LT50 del TCS

Concentración	LT50
1 µg/L	-
10 µg/L	-
100 µg/L	-
1000 µg/L	275 h
3000 µg/L	31,6 h
10000 µg/L	12,1 h

2.2.2. Efectos del triclosán sobre la expresión de genes relacionados con el sistema endocrino

Existen pocos estudios de la capacidad disruptora endocrina del TCS, por lo que se planteó el análisis de varios genes relacionados con la ruta de la respuesta a la ecdisona para evaluarla en este organismo. Se estudiaron los componentes del heterodímero que actúa de receptor a la ecdisona, el gen *EcR* y el gen *usp*, así como el gen *E74*, que codifica para un factor de transcripción que forma parte de la respuesta temprana a la ecdisona. Por último, también se estudió el gen *ERR*, un receptor hormonal nuclear cuyo ligando endógeno es desconocido. La alteración de esta ruta puede constituir un primer paso en el conocimiento del mecanismo de acción del TCS sobre invertebrados acuáticos.

El estudio realizado se centró en analizar los efectos del TCS después de 24 y 48 horas de exposición, tiempos en los que no se produjeron efectos letales en las larvas provocados por este compuesto, como se muestra en el apartado anterior. El análisis de los niveles de expresión por medio de RT-PCR en tiempo real mostró que los cuatro genes se vieron alterados por la exposición a TCS a tiempos cortos de 24 horas. El aumento de los niveles de expresión del ARNm del *usp*, *E74* y *ERR* se produjo a la concentración de 10 µg/L, mientras que para el gen *EcR* el incremento se produjo a 1000 µg/L. En

cambio, después de 48 horas de exposición los niveles de expresión de todos los genes estudiados recuperaron valores similares a los de las larvas sin tratar (Figura 25).

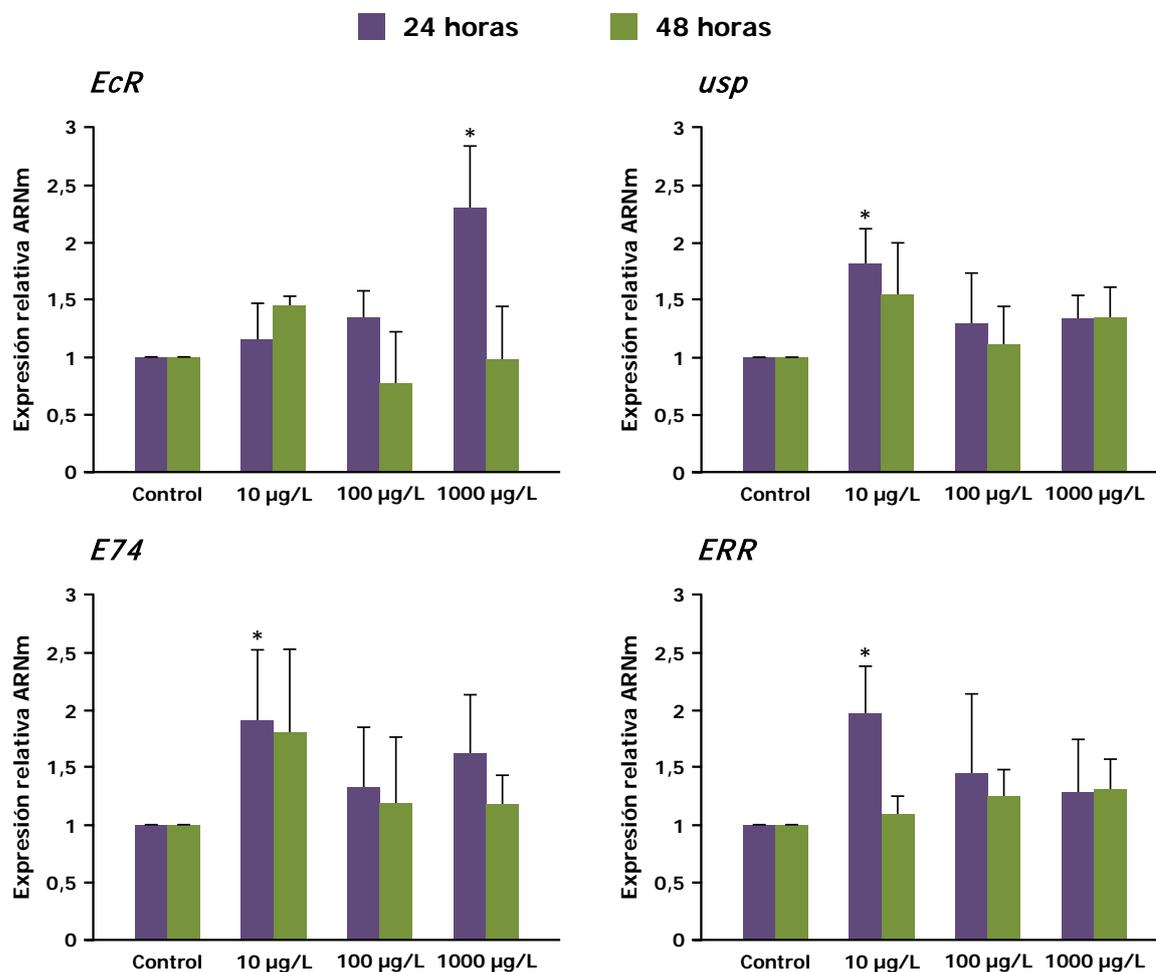


Figura 25. Efectos del TCS sobre genes de la ruta endocrina. Análisis de expresión del ARNm de los genes *EcR*, *usp*, *E74* y *ERR* de larvas de *C. riparius* expuestas a 10, 100 y 1000 µg/L de TCS durante 24 y 48 horas. Los datos representan los valores medios junto con el error estándar de la media respecto a los valores del control. Diferencias significativas: * $p \leq 0,05$.

Estos datos sugieren que el TCS afecta de manera temprana a la ruta de respuesta a la ecdisona en larvas de *C. riparius*, ya que es capaz de alterar los patrones de expresión de los cuatro genes seleccionados de respuesta a hormonas.

2.2.3. Efectos del triclosán en la respuesta a estrés celular

El análisis de la respuesta a estrés celular de larvas de *C. riparius* tras exposiciones a TCS se llevó a cabo mediante el estudio de dos proteínas de choque térmico. Se analizaron los niveles de expresión del ARNm de los genes *hsp70* y *hsp27* como posibles biomarcadores sensibles de estrés celular, ya que son genes que codifican para proteínas implicadas en la respuesta a situaciones de estrés ambiental.

Como se observa en la figura 26, en la que se muestran los resultados del estudio de expresión del ARNm y su análisis estadístico, sólo se produjo un aumento significativo en la expresión del gen *hsp70* a las 24 horas de exposición con la concentración más alta de TCS. Resultados similares se obtuvieron cuando se analizaron los niveles de expresión del gen *hsp27*, en el que incrementó la cantidad de su ARNm a la misma concentración que el gen *hsp70*.

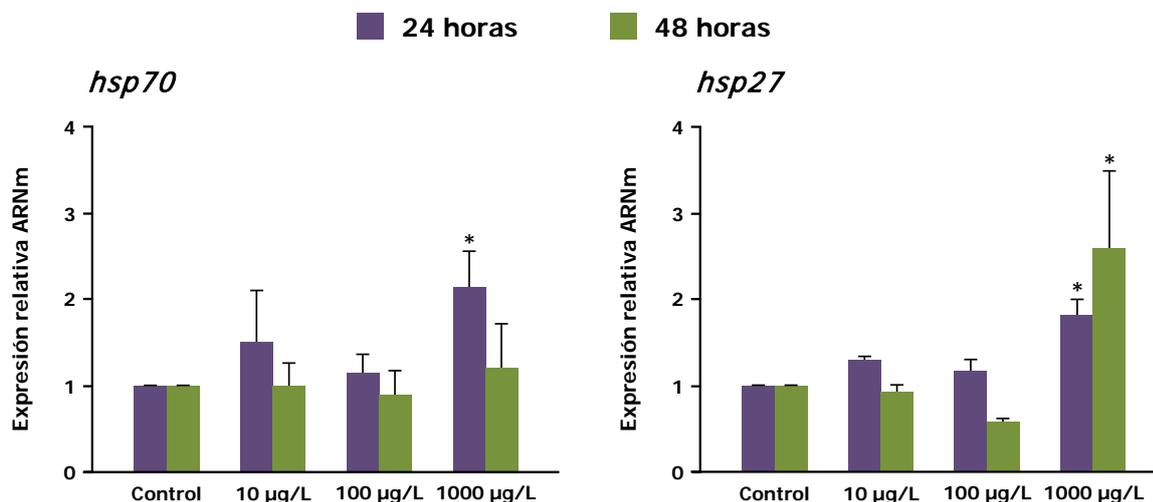


Figura 26. Efectos del TCS sobre genes de la respuesta a estrés celular. Análisis de expresión del ARNm de los genes *hsp70* y *hsp27* de larvas de *C. riparius* expuestas a 10, 100 y 1000 µg/L de TCS durante diferentes tiempos. Los valores representan la media y el error estándar de la media referenciados respecto al grupo control. Diferencias significativas: * $p \leq 0,05$.

La exposición a 48 horas produjo una respuesta diferente para cada uno de los genes estudiados. Mientras que los niveles de expresión del gen *hsp70* fueron similares a los de las larvas control en todas las concentraciones estudiadas, la activación producida en el gen *hsp27* se mantuvo con unos niveles de transcrito más elevados a la concentración de 1000 µg/L de TCS.

Estos resultados indican que puede darse una respuesta temprana a la concentración más alta de TCS que solo se mantiene a 48 horas de exposición en el caso del gen *hsp27*.

2.2.4. Efectos del triclosán sobre el sistema de detoxificación celular

El estudio del efecto del triclosán sobre el sistema de detoxificación en larvas de *C. riparius* se realizó a través del análisis de los cambios en la actividad transcripcional del gen *CYP4G* y de la actividad enzimática de la glutatión S-transferasa (GST).

Tal y como se muestra en la figura 27, la exposición de larvas de *C. riparius* a las concentraciones de 10, 100 y 1000 µg/L de TCS durante 24 horas produjo un aumento de la expresión de este gen dependiente de la dosis, siendo su expresión mayor a la concentración de exposición más baja,

aunque estos cambios no fueron estadísticamente significativos. Por otro lado, el análisis de los niveles de expresión del ARNm del gen *CYP4G* a tiempos largos de 48 horas no mostró ningún cambio cuando se comparó con la expresión de larvas no tratadas. De manera similar, la actividad enzimática de la GST no parece afectada por las exposiciones a TCS durante 24 y 48 horas a las concentraciones de 10, 100 y 1000 µg/L.

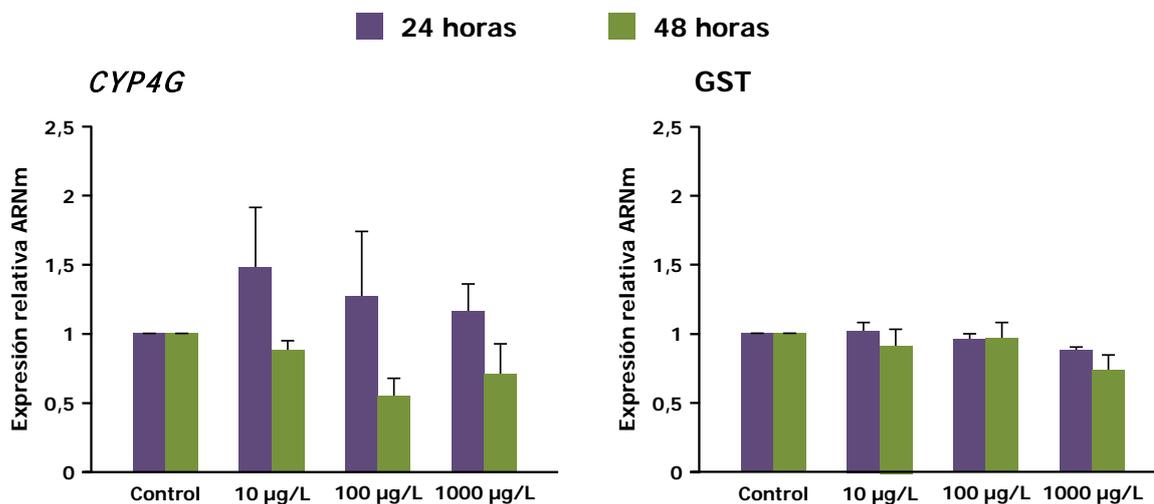


Figura 27. Efectos del TCS sobre el sistema de detoxificación celular. Análisis de expresión del ARNm del gen *CYP4G* y de la actividad enzimática de la GST de larvas de *C. riparius* expuestas a 10, 100 y 1000 µg/L de TCS durante diferentes tiempos. Las gráficas representan los valores medios de la expresión y el error estándar de la media relativizados respecto a los valores del grupo control.

2.2.5. Evaluación de la genotoxicidad del triclosán

Para valorar el daño genotóxico que puede producir el TCS sobre el ADN de larvas de *C. riparius* se empleó el ensayo cometa en condiciones alcalinas, estudiando los parámetros del porcentaje de ADN en cola, la longitud de la cola, momento cola y momento oliva ya que son considerados los más representativos.

Los resultados del daño en el ADN en larvas de cuarto estadio de *C. riparius*, representado en la figura 28 mediante momento oliva, muestran que el TCS afectó al ADN tanto a 24 como a 96 horas de exposición, siendo el efecto genotóxico dependiente de la concentración. La evaluación de los otros parámetros seleccionados (longitud de la cola, el porcentaje de ADN en cola y del momento cola) proporcionó resultados similares a los obtenidos mediante el análisis del momento oliva, demostrando la capacidad genotóxica de este compuesto químico (Tabla XIII). La comparación de los resultados obtenidos a las 24 horas con respecto a los de 96 horas de exposición reflejaron un aumento a la concentración más alta en todos los parámetros estudiados en los tratamientos largos, excepto en la longitud de la cola. Este hecho indica que hubo un aumento del daño total en el ADN,

mientras que no varió el tamaño del fragmento más pequeño producido entre las exposiciones de 24 y 96 horas. En cambio, a 10 µg/L se produjo una reducción significativa en todos los parámetros cuando se compararon las exposiciones de 96 horas frente a los resultados de 24 horas, sugiriendo una disminución en el efecto genotóxico en cuanto al daño total y el tamaño de los fragmentos producidos. Por último, en la exposición de 100 µg/L no se detectaron diferencias entre los dos tiempos de exposición excepto en la longitud de la cola, por lo que parece que no hubo variaciones en el daño total al ADN pero si en el tamaño del fragmento de ADN producido.

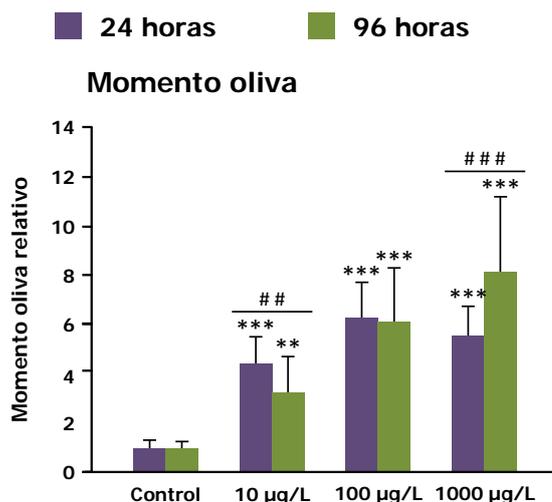


Figura 28. Daño en el ADN representado mediante el momento oliva. Análisis del daño genotóxico en el ADN de larvas de *C. riparius* expuestas a 10, 100 y 1000 µg/L de TCS durante 24 y 96 horas expresado mediante el momento oliva. Los valores representan la media y el error estándar de la media respecto a los valores del grupo control. Diferencias significativas respecto al control: ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001. Diferencias significativas entre los tratamientos de 24 y 96 horas: ## p ≤ 0,01; ### p ≤ 0,001.

Tabla XIII. Efectos genotóxicos del TCS sobre larvas de *C. riparius* analizados mediante diferentes parámetros del ensayo cometa. Los datos representan los valores medios y el error estándar de la media referidos a los valores del control. Diferencias significativas respecto al control: ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001. Diferencias significativas entre los tratamientos de 24 y 96 horas: ^a p ≤ 0,05; ^b p ≤ 0,01; ^c p ≤ 0,001.

Tiempo	Concentración	Longitud cola	% ADN en cola	Momento oliva	Momento cola
24 horas	Control	1,00 ± 0,30	1,00 ± 0,26	1,00 ± 0,34	1,00 ± 0,51
	10 µg/L	4,57 ± 0,99 ***	2,64 ± 0,42 ***	4,43 ± 1,11 ***	11,05 ± 3,79 ***
	100 µg/L	6,22 ± 1,18 ***	3,23 ± 0,46 ***	6,25 ± 1,46 ***	18,28 ± 5,45 ***
	1000 µg/L	5,71 ± 0,85 ***	3,32 ± 0,42 ***	5,60 ± 1,17 ***	16,99 ± 4,32 ***
96 horas	Control	1,00 ± 0,28	1,00 ± 0,23	1,00 ± 0,28	1,00 ± 0,38
	10 µg/L	2,92 ± 0,94 *** ^c	2,29 ± 0,56 *** ^a	3,24 ± 1,46 ** ^b	7,34 ± 4,59 ** ^a
	100 µg/L	4,87 ± 1,24 *** ^c	3,18 ± 0,62 ***	6,14 ± 2,18 ***	15,78 ± 7,10 ***
	1000 µg/L	5,52 ± 1,39 ***	4,04 ± 0,63 *** ^c	8,17 ± 3,03 *** ^c	22,22 ± 8,86 *** ^a

En conjunto, estos resultados sugieren que el TCS tiene capacidad genotóxica, la cual depende de la concentración y tiempo de exposición, lo que podría reflejar tanto la respuesta variable de la célula como la capacidad de producir daño en el ADN del TCS dependiente de su concentración.

El triclosán (TCS) provocó alteraciones en la respuesta endocrina al inducir cambios en los patrones de expresión de los genes *EcR*, *usp*, *E74* y *ERR* después de 24 horas de exposición con este compuesto, recuperándose los niveles normales de expresión a las 48 horas. En el caso de la respuesta a estrés se observó que tanto el gen *hsp70* como el gen *hsp27* se vieron afectados a la mayor concentración estudiada, incrementando su actividad transcripcional a las 24 horas de exposición, manteniéndose solo en el caso del gen *hsp27* a las 48 horas de tratamiento. Por otro lado, el sistema de detoxificación de *C. riparius* no mostró ningún cambio significativo tras exposiciones a 24 y 48 horas con TCS, tanto a nivel de expresión del gen *CYP4G* como de la actividad enzimática de la GST.

Por último, el estudio del daño en el ADN mostró que el TCS es un compuesto genotóxico al producir a todas las concentraciones y tiempos estudiados daño en el ADN. Además, mientras a 10 µg/L se produjo un descenso significativo del daño después de 96 horas de exposición, a la concentración de 1000 µg/L el daño en el ADN aumentó a este mismo tiempo con respecto a 24 horas de exposición.

2.3. Efectos del bisfenol A sobre larvas de *Chironomus riparius*

Estudios previos han demostrado la capacidad disruptora endocrina del bisfenol A (BPA) sobre larvas de *C. riparius* expuestas a 3 mg/L después de 12 y 24 horas, además de aumentar los niveles de expresión del gen *hsp70* (Planelló y col., 2008). En este estudio se planteó la búsqueda de otros biomarcadores, tanto a nivel molecular como celular, empleando exposiciones prolongadas a una concentración más baja de BPA (0,5 mg/L), seleccionada en base a la bibliografía existente en *Chironomus* (Hahn y col., 2002; Segner y col., 2003; Watts y col., 2003; Park y Kwak, 2010).

2.3.1. Análisis de la toxicidad del bisfenol A

Para analizar si las concentraciones de BPA a emplear podían tener efectos sobre la supervivencia de poblaciones de laboratorio de *C. riparius* se analizó en primer lugar la toxicidad a intervalos de 24 horas hasta 96 horas de exposición.

La exposición a 0,5 mg/L de BPA no produjo un aumento de la mortalidad en ninguno de los tiempos estudiados cuando se compararon los resultados con larvas no tratadas. En cambio, la exposición a 3 mg/L de BPA produjo un descenso de la supervivencia de las larvas después de 72 y 96 horas de tratamiento (Figura 29).

Por otro lado, el análisis de datos con el programa informático DEBtox mostró que hay una relación entre el tiempo de exposición y el resultado del valor LC50, así como existe una relación entre la concentración de exposición y el resultado del valor LT50 (Tabla XIV y Tabla XV).

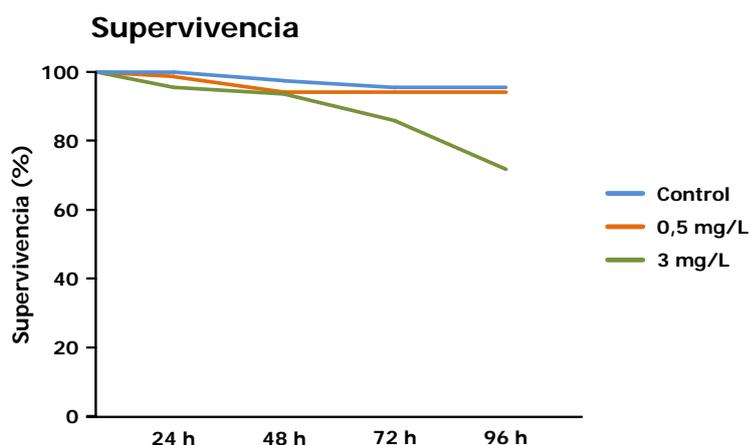


Figura 29. Curva de supervivencia del BPA. Efecto de la exposición a 0,5 y 3 mg/L de BPA sobre la supervivencia de larvas de cuarto estadio de *C. riparius* hasta 96 horas de exposición.

Tabla XIV. Valores LC50 del BPA

Tiempo	LC50
24 horas	55,6 g/L
48 horas	16,1 g/L
72 horas	8,1 g/L
96 horas	5,07 g/L

Tabla XV. Valores LT50 del BPA

Concentración	LT50
0,5 mg/L	470 h
3 mg/L	134 h

2.3.2. Efectos del bisfenol A sobre la expresión de genes relacionados con el sistema endocrino

Estudios previos han demostrado la capacidad del BPA de aumentar los niveles de expresión del gen *EcR* a 3 mg/L. Sin embargo, las concentraciones presentes en la naturaleza suelen ser menores, por lo que para analizar la capacidad disruptora endocrina de este compuesto a una concentración más próxima a la presente en el medio ambiente se analizaron los niveles de expresión de los genes *EcR* y *ERR* por medio de RT-PCR en tiempo real tras exposiciones durante 24, 48, 72 y 96 horas a 0,5 mg/L.

Los resultados obtenidos de la cuantificación y análisis de los niveles de expresión de los genes *EcR* y *ERR* se muestran en la figura 30. Aunque a 24 horas de exposición hubo una tendencia a disminuir la cantidad del transcrito, a las 48 horas se produjo un aumento significativo de los niveles de ARNm del gen *EcR*, recuperando los niveles de larvas no tratadas a tiempos más largos de exposición. En el caso del gen *ERR*, hubo una disminución de la expresión de su ARNm, aumentando sus niveles a las 48 horas de exposición, aunque no estadísticamente significativo, siguiendo una tendencia similar a la observada en el gen *EcR*, con un incremento de expresión a las 48 horas que recupera progresivamente los valores de las muestras control a tiempos posteriores.

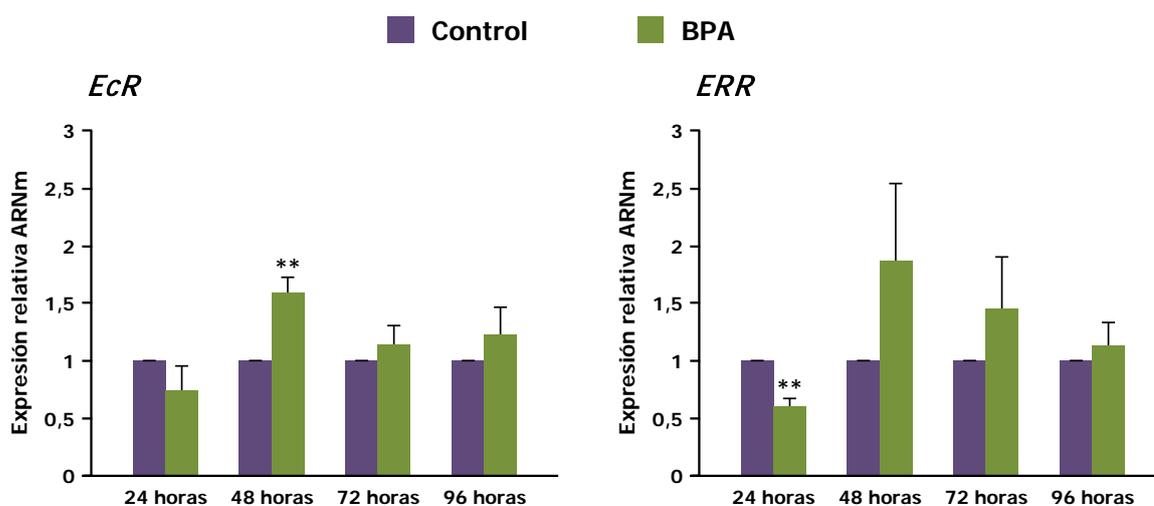


Figura 30. Efectos del BPA sobre genes de la ruta endocrina. Análisis de expresión del ARNm de los genes *EcR* y *ERR* de larvas de *C. riparius* expuestas a 0,5 mg/L de BPA durante 24, 48, 72 y 96 horas. Los datos representan los valores medios junto con el error estándar de la media respecto al valor del control. Diferencias significativas: ** $p \leq 0,01$.

2.3.3. Efectos del bisfenol A en la respuesta a estrés celular

La respuesta a estrés celular es un mecanismo de defensa que han desarrollado los seres vivos para contrarrestar los efectos de ambientes desfavorables. El estudio de la respuesta a estrés celular de larvas de *C. riparius* sometidas a BPA durante 24, 48, 72 y 96 horas se realizó mediante el análisis de los niveles de expresión del gen *hsp70*, que codifica para la proteína HSP70, cuya actividad chaperona protege a las proteínas ya maduras de situaciones de estrés ambiental.

Los resultados muestran que el BPA fue capaz de aumentar los niveles de expresión del gen *hsp70* tras 72 horas de exposición, recuperando los niveles de expresión a las 96 horas de exposición, tal y como se muestra en la figura 31. Las exposiciones durante 24 y 48 horas con BPA no produjeron cambios en los niveles de expresión del ARNm del gen *hsp70* cuando se compararon sus valores con respecto a larvas no tratadas con BPA.

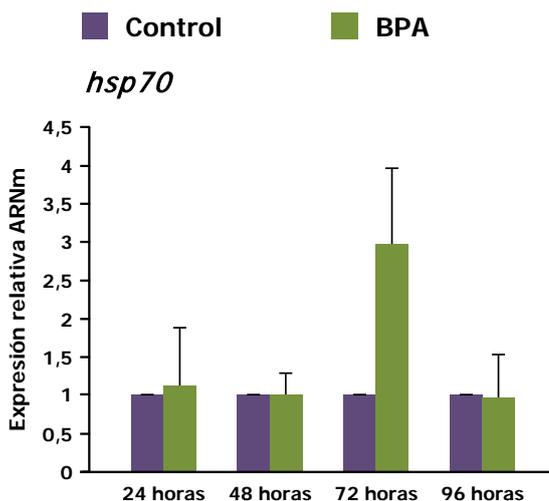


Figura 31. Efectos del BPA sobre el gen de la respuesta a estrés celular. Análisis de expresión del ARNm del gen *hsp70* de larvas de *C. riparius* expuestas a 0,5 mg/L de BPA durante 24, 48, 72 y 96 horas. Los datos representan los valores medios junto con el error estándar de la media respecto al valor del control.

2.3.4. Efectos del bisfenol A sobre el sistema de detoxificación celular

El estudio del sistema de detoxificación celular en larvas de *C. riparius* en presencia de xenobióticos es interesante para la búsqueda de biomarcadores celulares que sean posibles dianas de acción de compuestos tóxicos. Tras exposiciones con BPA a larvas de cuarto estadio de *C. riparius* durante 24, 48, 72 y 96 horas se estudiaron la fase I y la fase II del sistema de detoxificación celular, analizando los niveles del ARNm del gen *CYP4G* y la actividad enzimática de la GST, respectivamente.

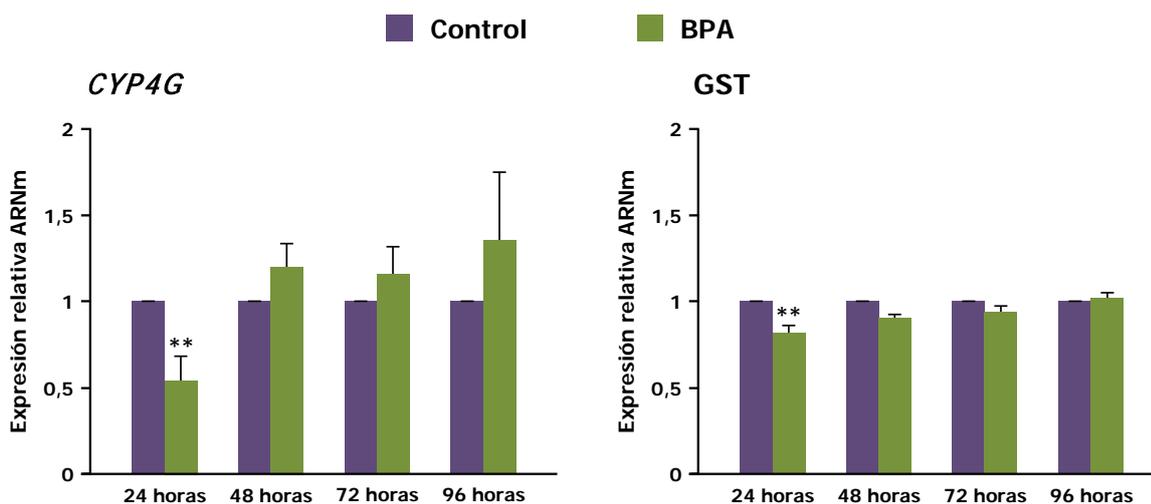


Figura 32. Efectos del BPA sobre el sistema de detoxificación celular. Análisis de expresión del ARNm del gen *CYP4G* y de la actividad enzimática de la GST de larvas de *C. riparius* expuestas 0,5 mg/L de BPA durante 24, 48, 72 y 96 horas. Las gráficas representan los valores medios y el error estándar de la media respecto a los valores del control. Diferencias significativas: ** $p \leq 0,01$.

Como puede observarse en la figura 32, la exposición a 0,5 mg/L de BPA redujo significativamente los niveles de expresión del gen *CYP4G* y de la actividad enzimática de la GST después de 24 horas de exposición, recuperando niveles similares a los de larvas no tratadas a las 48 horas y manteniéndose inalteradas en exposiciones prolongadas de hasta 96 horas.

2.3.5. Evaluación de la genotoxicidad del bisfenol A

Park y Choi (2009) demostraron la capacidad genotóxica del BPA a 24 horas de exposición. Como se ha observado con el TCS y el NP, la dinámica de la respuesta puede variar según el compuesto estudiado, por lo que se planteó el análisis de la acción genotóxica del BPA a tiempos largos de exposición a las concentraciones de 0,5 y 3 mg/L.

La exposición durante 24 y 96 horas a las concentraciones estudiadas produjeron daño sobre el ADN en larvas de *C. riparius*. Sin embargo, el daño producido a las 24 horas de exposición no mostró una relación dependiente de la concentración, mientras que a las 96 horas sí se observó esta tendencia (Figura 33). Por otro lado, la comparación del efecto observado entre las exposiciones de 24 y 96 horas para cada concentración mostró una disminución en el daño en el ADN a largo plazo a 0,5 mg/L, ya que todos los parámetros analizados presentaron una reducción estadísticamente significativa, mientras que esto no ocurrió con la mayor concentración empleada (Tabla XVI). Esto indica que a 0,5 mg/L se produjo un menor daño total y una reducción del tamaño de los fragmentos de ADN producidos durante exposiciones prolongadas.

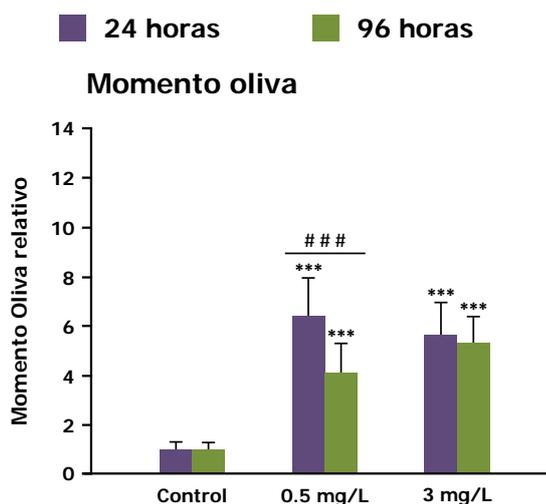


Figura 33. Daño en el ADN representado mediante el momento oliva. Análisis del daño genotóxico en el ADN de larvas de *C. riparius* expuestas a 0,5 y 3 mg/L de bisfenol A durante 24 y 96 horas expresado mediante el momento oliva. Los valores representan la media y el error estándar de la media relativizados respecto a los grupos control. Diferencias significativas respecto al control: *** $p \leq 0,001$. Diferencias significativas entre los tratamientos de 24 y 96 horas: ### $p \leq 0,001$.

Tabla XVI. Efectos genotóxicos del BPA sobre larvas de *C. riparius* estudiados mediante diferentes parámetros del ensayo cometa. Los datos representan los valores medios y el error estándar de la media respecto a los valores del control. Diferencias significativas respecto al control: *** $p \leq 0,001$. Diferencias significativas entre los tratamientos de 24 y 96 horas: ^c $p \leq 0,001$.

Tiempo	Concentración	Longitud cola	% ADN en cola	Momento oliva	Momento cola
24 horas	Control	1,00 ± 0,34	1,00 ± 0,23	1,00 ± 0,32	1,00 ± 0,55
	0,5 mg/L	4,96 ± 0,81 ***	3,63 ± 0,62 ***	6,43 ± 1,52 ***	16,41 ± 4,70 ***
	3 mg/L	4,85 ± 0,89 ***	3,33 ± 0,50 ***	5,69 ± 1,27 ***	14,91 ± 4,50 ***
96 horas	Control	1,00 ± 0,31	1,00 ± 0,22	1,00 ± 0,27	1,00 ± 0,49
	0,5 mg/L	3,69 ± 0,83 *** ^c	2,92 ± 0,54 *** ^c	4,14 ± 1,16 *** ^c	10,40 ± 3,79 *** ^c
	3 mg/L	5,08 ± 0,73 ***	3,25 ± 0,47 ***	5,31 ± 1,06 ***	15,15 ± 4,04 ***

El bisfenol A (BPA) produjo un incremento en los niveles de expresión de los genes *EcR* y *ERR*, implicados en el sistema endocrino tras 48 horas de exposición a 0,5 mg/L, recuperándose los niveles de expresión a tiempos posteriores. Por otro lado, el BPA fue capaz de aumentar los niveles de expresión del ARNm del gen *hsp70* después de 72 horas de exposición, no viéndose alterados sus niveles en el resto de tiempos analizados. Además, el efecto sobre el sistema de detoxificación celular se tradujo en un descenso tanto de la expresión del gen *CYP4G* como de la actividad enzimática de la GST después de 24 horas de exposición, volviendo a recuperar los valores de larvas control de ambos parámetros a tiempos más largos de exposición.

Finalmente, se confirmó la capacidad genotóxica del BPA, aunque mostró una tendencia diferente dependiendo de la concentración empleada. De esta manera, el efecto a las 24 horas fue mayor a concentraciones más bajas de producto pero los efectos se mantuvieron sin cambios a la mayor concentración.

DISCUSIÓN

Los seres vivos se encuentran expuestos a una gran cantidad y variedad de compuestos químicos de origen antropogénico que pueden producir efectos nocivos sobre ellos. Estas alteraciones, que se manifiestan en última instancia en cambios en el patrón de expresión de sus genes, difieren en función de las propiedades químicas de cada compuesto. Para conocer los efectos tóxicos es necesario analizar cómo actúan a nivel molecular, por lo que el desarrollo de técnicas que permitan conocer las dianas celulares resulta cada vez más necesario dentro del campo de la ecotoxicología. En esta tesis se planteó la búsqueda e identificación de dianas de acción específicas de los compuestos xenobióticos nonilfenol, triclosán y bisfenol A, con la finalidad de llegar a conocer sus mecanismos de acción en invertebrados. Con este objetivo se seleccionaron potenciales biomarcadores asociados con el sistema endocrino, la respuesta a estrés celular, el sistema de detoxificación y el efecto genotóxico. El organismo empleado en este estudio fue *Chironomus riparius*, un macroinvertebrado bentónico considerado como modelo de referencia en ensayos de toxicidad en ecosistemas acuáticos.

1. LOS GENES *CYP4G*, *hsp27* Y *EcR* DE *Chironomus riparius*

La escasa información genómica en especies de invertebrados acuáticos de interés ecotoxicológico (Piña y Barata, 2011) hace que la obtención de la secuencia de nucleótidos de diferentes genes ofrezca una información útil como nueva herramienta para el estudio del efecto del medio ambiente sobre los genes. En el futuro, el uso de *microarrays* de ADN y la proteómica tendrán un importante impacto en la evaluación ecotoxicológica de los contaminantes y en la comprensión de sus mecanismos de acción. En este sentido, y debido a la ausencia de un proyecto genoma de *C. riparius*, la primera etapa del trabajo consistió en la obtención de la secuencia de tres genes de interés que pudieran tener relación con la respuesta frente a compuestos tóxicos. Los genes seleccionados fueron el *citocromo P450 4G (CYP4G)*, implicado en los procesos de detoxificación, la proteína de choque térmico de pequeño tamaño *hsp27* y el *receptor de ecdisona (EcR)*. Además se obtuvo un fragmento de la secuencia de nucleótidos del gen *E74*, que codifica para una proteína de respuesta temprana a ecdisona.

El análisis de la secuencia de nucleótidos del gen *CYP4G*, la cual presenta un intrón de 63 pb, confirmó que pertenece a la familia 4 y subfamilia G de los genes *citocromo P450 (CYP)*. Se ha descrito previamente que algunos genes *CYP4* poseen intrones de un tamaño comprendido entre 60 y 79 pb (Snyder, 2000), por lo que el intrón observado se encuentra dentro del tamaño esperado. La secuencia de aminoácidos deducida presenta los motivos típicos de las proteínas P450, los cuales

tienen un alto grado de identidad de secuencia con otros citocromos P450 de insectos e, incluso, de vertebrados. Cuando se compara con las secuencias de otros insectos se observa que existe un bajo número de aminoácidos conservados, a excepción de los cinco motivos típicos de la proteína: el motivo WxxxR, el motivo GxE/DTT/S, el motivo ExLR, el motivo PxxFxPE/DRF y el motivo PFxxFxRxCxG/A (Feyereisen, 2005). A pesar de esta divergencia en la secuencia, existe un alto grado de conservación en la estructura tridimensional de la proteína. La familia CYP4 es una de las más antiguas dentro de la superfamilia de enzimas P450, habiéndose identificado veintidós subfamilias CYP4, las cuales están presentes en casi todas las especies de insectos realizando una gran diversidad de funciones (Feyereisen, 2006). En cambio, en mamíferos existen seis subfamilias diferentes, relacionadas principalmente con el catabolismo de oxidación de ácidos grasos endógenos y la bioactivación de algunos xenobióticos (Rettie y Kelly, 2008).

El gen *CYP4G* se localizó por hibridación *in situ* en la región II-A2 del brazo derecho del cromosoma II. Solo se detectó una única banda, por lo que se encuentra situado en un único locus del genoma de *C. riparius*. La mayoría de genes *CYP* de insectos se encuentran agrupados en cromosomas individuales, lo que refleja la diversidad a través de la duplicación génica y de la divergencia de funciones (Snyder, 2000), siendo posible la presencia de otros genes *CYP* en el cromosoma II. La localización del gen *CYP4G* ofrece la posibilidad de incluir una aproximación citogenética en el análisis de los efectos de los contaminantes en posteriores estudios sobre cromosomas politénicos de esta especie.

El estudio de la secuencia de nucleótidos del gen *hsp27* muestra que no presenta intrones mientras que la secuencia de aminoácidos deducida contiene los motivos típicos descritos en la proteína HSP27 de otras especies (Sun y MacRae, 2005). La identidad de secuencia con las proteínas HSP27 de *D. melanogaster*, HSP27 de *C. capitata* y HSP25 de *S. crassipalpis* es de aproximadamente el 50 % con respecto a la HSP27 de *C. riparius*. A pesar del alto porcentaje de identidad de secuencia, estos datos contrastan con la proteína HSP70 de *C. riparius*, la cual está altamente conservada, tanto a nivel de secuencia de ADN como de proteína, compartiendo entre el 80 y el 96 % de identidad entre los aminoácidos con las secuencias homólogas de otros dípteros (Morales y col., 2011). Estos resultados están de acuerdo con estudios previos que demuestran que la familia de las proteínas de choque térmico de pequeño tamaño (sHSPs) es la menos conservada, a excepción del dominio α -cristalino, dentro de las distintas familias de HSPs (Denlinger y col., 2001). Además del dominio α -cristalino, en la HSP27 de *C. riparius* existen tres regiones conservadas en los homólogos de *D. melanogaster*, *C. capitata* y *S. crassipalpis*. La primera región, localizada en el extremo amino-terminal de la proteína (aa M₁-I₁₁ de CrHSP27) es muy hidrofóbica y es el menos conservado entre los cuatro homólogos de la HSP27, mostrando un 30 % de identidad de secuencias de aminoácidos. Esta región hidrofóbica

también se encuentra presente en la HSP23 y HSP26 de *D. melanogaster*, pero no en la HSP22 de *D. melanogaster* (Southgate y col., 1983) y se cree que juega un papel en la oligomerización y en la actividad chaperona de las sHSPs (Sun y MacRae, 2005). La segunda región, localizada entre los aminoácidos D₃₇-N₄₉ de CrHSP27 presenta un 50 % de identidad en la secuencia de aminoácidos entre los cuatro homólogos de la HSP27. Es importante destacar que esta región es específica de la HSP27 (Kokolakis y col., 2008), lo que sugiere que juega un papel diferencial en esta proteína. La tercera región se encuentra situada junto al extremo carboxi-terminal del dominio α -cristalino, entre los aminoácidos K₁₅₉-K₁₈₆ de CrHSP27, presenta un 50 % de identidad en la secuencia de aminoácidos con el resto de homólogos y se encuentra presente en las otras sHSPs de *D. melanogaster* (Southgate y col., 1983). Además, la HSP27 de *C. riparius* presenta una única cisteína conservada en la posición 91. La ausencia o la escasa presencia de residuos de cisteína es una característica de la familia de las proteínas chaperonas (Fu y col., 2003) y estudios previos han demostrado que la presencia de una cisteína en la HSP27 en células humanas tiene un papel regulador en la señalización apoptótica (Bruey y col., 2000). Se necesitan más estudios para determinar si la cisteína conservada de la HSP27 de *C. riparius* tiene funciones similares a las halladas en cultivos celulares para la HSP27 de mamíferos (Fu y col., 2003).

Recientemente se han obtenido en nuestro laboratorio las secuencias de los genes *hsp17*, *hsp21*, *hsp22*, *hsp23*, *hsp24* y *hsp34* de *C. riparius*. De manera similar a lo descrito en *D. melanogaster*, en la que se muestra un bajo grado de homología entre los diferentes miembros de la familia de sHSPs (Southgate y col., 1983), existe una baja homología a nivel de la secuencia de aminoácidos deducida entre las sHSPs de *C. riparius*. Como puede observarse en la tabla XVII, la proteína HSP27 presenta la mayor identidad de secuencia con la proteína HSP24, mientras que con la proteína HSP34 es con la que comparte menor homología. Por otro lado, la comparación del dominio α -cristalino de las diferentes sHSPs de *C. riparius*, previamente obtenido a través de la base de datos de dominios conservados del NCBI, muestra que, como era de esperar, se encuentra altamente conservado entre todas ellas, siendo con las proteínas HSP22 y HSP24 con las que mayor homología presenta la HSP27 (Tabla XVIII). Este dominio, que define a las sHSPs, se encuentra altamente conservado desde procariontes a eucariotes (de Jong y col., 1998). Además, los dominios α -cristalino de las sHSPs de *C. riparius* presentan una estructura tridimensional muy conservada. Como puede observarse en la figura 34, este dominio presenta dos grupos de tres lámina- β cada uno, siendo la diferencia fundamental entre cada una de ellos la presencia de una α -hélice, en el caso de la HSP17 y la HSP21, o de dos α -hélices, en el caso de la HSP22, la HSP23, la HSP24, la HSP27 y la HSP34. La estructura tridimensional de este dominio está altamente conservada, siendo la presencia y longitud de las regiones en α -hélice variable (Caspers y col., 1995; Leroux y col., 1997a; Liang y col., 1997). Se ha

descrito que la presencia de láminas- β plegadas es un hecho característico del dominio α -cristalino de las sHSPs (MacRae, 2000), siendo ésta su unidad básica estructural, cuya función es la de facilitar la formación de dímeros y la consecuente oligomerización de estas proteínas (Sun y MacRae, 2005). Por otro lado, se ha descrito que las α -hélices del dominio α -cristalino podrían estar implicadas en la inserción en membranas o para promover la interacción específica entre proteínas (de Jong y col., 1993). La presencia de dos α -hélices en este dominio de la HSP27 de *C. riparius* coincide con lo descrito previamente para la HSP27 de *Apis cerana* (Liu y col., 2012), por lo que inicialmente no difiere a nivel estructural de sus homólogos en otros insectos.

Tabla XVII. Comparación de la secuencia de aminoácidos de las sHSPs con la HSP27 de *C. riparius* (en %)

	HSP17	HSP21	HSP22	HSP23	HSP24	HSP34
Identities	28,06	25,25	38,10	29,21	44,39	19,08
Fuertemente similar	17,86	18,81	19,52	20,30	17,29	17,11
Débilmente similar	11,73	15,84	8,57	15,35	7,94	11,51
Diferentes	42,35	40,10	33,81	33,14	30,38	52,30

TABLA XVIII. Comparación de secuencia de aminoácidos del dominio α -cristalino de las sHSPs con la HSP27 de *C. riparius* (en %)

	HSP17	HSP21	HSP22	HSP23	HSP24	HSP34
Identities	36,59	38,55	62,20	48,19	63,41	36,14
Fuertemente similar	21,95	20,48	15,85	15,66	13,41	25,30
Débilmente similar	14,63	19,28	7,32	15,66	8,54	15,66
Diferentes	26,83	21,69	14,63	20,49	14,64	22,90

Finalmente, la localización del gen *hsp27* mediante hibridación *in situ* a partir de cromosomas politénicos de células de la glándula salivar mostró que está presente en un único locus localizado en la región I-C4 del brazo derecho del cromosoma I. Su localización puede permitir en un futuro observar los cambios en los patrones de expresión en cromosomas politénicos producidos por la exposición a compuestos xenobióticos.

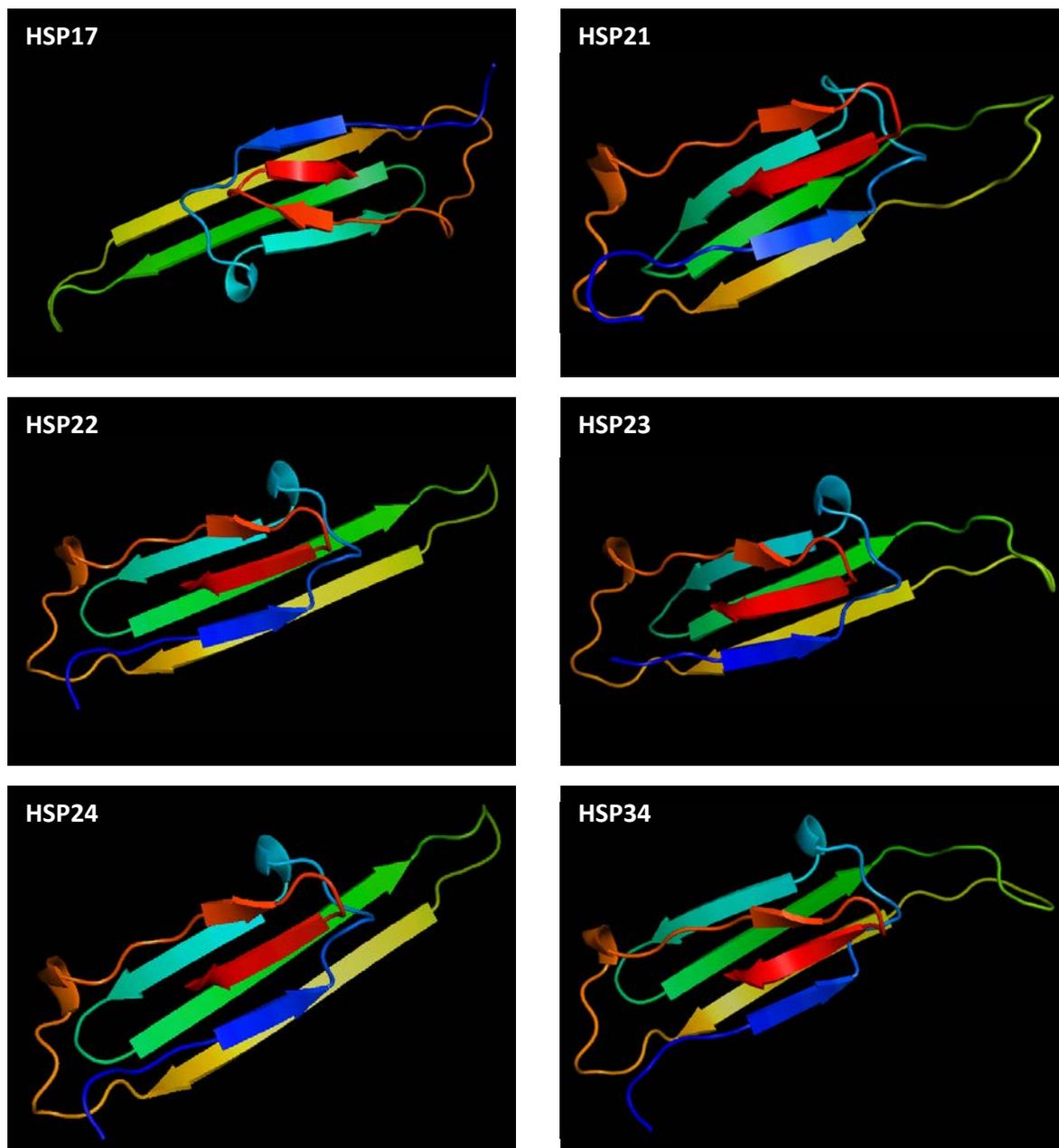


Figura 34. Estructura tridimensional del dominio α -cristalino de la HSP17, HSP21, HSP22, HSP23, HSP24 y HSP34 de *C. riparius*. La topología de este dominio de las diferentes sHSPs aisladas de *C. riparius* se ha obtenido mediante la modelización por homología tal y como se indica en el apartado 2.9.2.1 de materiales y métodos.

La secuencia de nucleótidos del gen *EcR* de *C. riparius* contiene cuatro intrones en su región codificante, característica común de los genes *EcR* de otras especies de insectos (Koelle y col., 1991; Shirai y col., 2007; Tan y Palli, 2008; Shen y col., 2013). La secuencia de aminoácidos deducida de la proteína *EcR* de *C. riparius* contiene los dominios de unión a ADN y de unión a hormona, característicos de la familia de factores de transcripción regulados por ligando, y cumple todos los requisitos para poder incluirla dentro de la superfamilia de receptores de esteroides. En el extremo

N-terminal se encuentra el dominio A/B, que es altamente variable y contiene el dominio de activación de la transcripción, el cual es independiente de la unión del ligando (Shen y col., 2013). El dominio de unión a ADN (dominio C) contiene un dedo de Zinc cuya secuencia está conservada en todos los receptores de hormonas nucleares (Borden y Freemont, 1996) y presenta la caja P y la caja D, implicadas en el reconocimiento específico del elemento de respuesta a hormonas (Umesono y Evans, 1989). El dominio de unión a hormona (dominio E) incluye un motivo cremallera hélice-giro que se encuentra conservado en muchos receptores nucleares, además de contribuir en el proceso de heterodimerización (Maksymowych y col., 1992). La secuencia de aminoácidos presenta dos heptapéptidos dentro del dominio D que actúan como señal de localización nuclear (Kalderon y col., 1984), los cuales se encuentran en otras proteínas EcR de insectos (Cho y col., 1995; Hannan y Hill, 1997; Verras y col., 1999). Por último se encuentra el dominio F, el cual presenta grandes diferencias entre los insectos dípteros y lepidópteros y cuya función es desconocida (Bonneton y col., 2003).

Por otro lado, la proteína EcR de *C. riparius* es similar en cuanto a los dominios con las proteínas EcR de otros dípteros, presentando los cinco dominios característicos de los receptores nucleares de hormonas. La región con mayor identidad de secuencia entre la proteína EcR de *C. riparius* con las de otros dípteros se encuentra en el dominio de unión a ADN, variando entre el 95 y el 100 % (Tabla XIX). De igual manera, el dominio de unión a ligando presenta una alta identidad de secuencia con otros dípteros, siendo aproximadamente del 75 %, excepto para el caso de *C. tentans*, en el que las identidades alcanzan el 91 %. Finalmente, los dominios A/B y F, los cuales son muy variables en cuanto a longitud y a secuencia de aminoácidos, son los menos conservados presentando cerca de un 20 % y de un 10 % de identidad de secuencia respectivamente, excepto en el caso de *C. tentans*.

Se ha descrito la presencia de distintas isoformas de la proteína EcR en diferentes especies. En el hemíptero *Nezara viridula* existen dos formas que difieren en el dominio A/B, producidos por un sitio alternativo de inicio de la traducción, y en el dominio E, generado mediante *splicing* alternativo (Tohidi-Esfahani y col., 2011). Además se han descrito dos isoformas en *Tribolium castaneum* como consecuencia de *splicing* alternativo (Tan y Palli, 2008) y tres isoformas en *D. melanogaster*, las cuales contienen un extremo carboxi-terminal común, pero difieren en el extremo amino-terminal (Talbot y col., 1993). De manera similar se ha observado la presencia de isoformas de la proteína EcR en crustáceos, como ocurre en *Crangon crangon*, en la que las diferentes isoformas dependen de variaciones durante la traducción, producidas por la existencia de un sitio alternativo de inicio y de final de la traducción (Verhaegen y col., 2011). Otro crustáceo, la gamba de río *Macrobrachium nipponense*, presenta cuatro variantes de la proteína EcR producidas por *splicing* alternativo (Shen y col., 2013). Sin embargo, a pesar de la frecuencia de la existencia de isoformas, no se ha observado

ninguna variante transcripcional de la proteína EcR en *C. riparius*, siendo necesarios más estudios para confirmar que este organismo solo presenta una única isoforma.

TABLA XIX. Comparación de la secuencia de aminoácidos de los dominios de la proteína EcR de diferentes dípteros con la proteína EcR de *C. riparius* (en %)

	Identities	Fuertemente similar	Débilmente similar	Diferentes
A/B	<i>C. tentans</i>	100	0	0
	<i>D. melanogaster</i>	12,93	12,93	7,6
	<i>C. capitata</i>	14,57	8,91	11,34
	<i>L. cuprina</i>	11,67	10,67	6,67
	<i>A. aegypti</i>	17,99	12,17	15,34
	<i>B. dorsalis</i>	19,30	4,39	7,02
	<i>C. quinquefasciatus</i>	26,32	9,65	7,02
	<i>C. vicina</i>	12,06	8,25	7,30
	<i>S. mosellana</i>	20,18	3,51	5,26
C	<i>C. tentans</i>	100	0	0
	<i>D. melanogaster</i>	95,45	1,52	1,52
	<i>C. capitata</i>	95,45	3,03	1,52
	<i>L. cuprina</i>	98,48	0	0
	<i>A. aegypti</i>	96,97	0	0
	<i>B. dorsalis</i>	95,45	3,03	1,52
	<i>C. quinquefasciatus</i>	98,48	0	0
	<i>C. vicina</i>	96,97	1,52	0
	<i>S. mosellana</i>	100	0	0
D	<i>C. tentans</i>	91,07	1,79	1,79
	<i>D. melanogaster</i>	50,89	15,18	9,82
	<i>C. capitata</i>	48,21	16,07	8,04
	<i>L. cuprina</i>	50,00	11,61	7,14
	<i>A. aegypti</i>	59,82	6,25	4,46
	<i>B. dorsalis</i>	50,00	15,18	7,14
	<i>C. quinquefasciatus</i>	58,93	7,14	6,25
	<i>C. vicina</i>	49,11	11,61	7,14
	<i>S. mosellana</i>	54,87	8,85	3,54
E	<i>C. tentans</i>	99,10	0,45	0,45
	<i>D. melanogaster</i>	73,99	16,14	3,59
	<i>C. capitata</i>	74,44	15,25	2,69
	<i>L. cuprina</i>	75,78	14,35	3,59
	<i>A. aegypti</i>	77,13	14,80	1,79
	<i>B. dorsalis</i>	75,34	15,25	3,59
	<i>C. quinquefasciatus</i>	78,03	14,35	0,90
	<i>C. vicina</i>	75,78	14,35	4,04
	<i>S. mosellana</i>	74,55	15,62	2,68
F	<i>C. tentans</i>	95,83	0	4,17
	<i>D. melanogaster</i>	1,33	3,54	3,10
	<i>C. capitata</i>	8,51	12,77	2,13
	<i>L. cuprina</i>	4,82	7,23	10,84
	<i>A. aegypti</i>	1,90	10,48	4,76
	<i>B. dorsalis</i>	4,11	3,42	4,79
	<i>C. quinquefasciatus</i>	7,06	8,24	7,06
	<i>C. vicina</i>	8,51	4,26	5,32
	<i>S. mosellana</i>	17,07	21,95	2,44

De acuerdo con los puntos anteriores, la estructura tridimensional de la proteína parece mantenerse conservada de acuerdo con el estudio estructural llevado a cabo, ya que tanto el dominio C como el dominio E de la proteína EcR de *C. riparius* presentan la estructuras típicas descritas en otros EcR tal y como se observa en la figura 17 tras el modelado por homología.

2. TOXICIDAD DEL NONILFENOL, TRICLOSÁN Y BISFENOL A EN *Chironomus riparius*

La segunda parte del trabajo presentado en esta tesis se centró en la evaluación de los efectos tóxicos del nonilfenol, triclosán y bisfenol A sobre larvas de *C. riparius* tras exposiciones a diferentes concentraciones y tiempos con estos compuestos. Estos tres compuestos xenobióticos se seleccionaron al encontrarse frecuentemente como contaminantes en los ecosistemas de agua dulce y por su conocido potencial disruptor endocrino en diferentes organismos. La elección de las concentraciones de ensayo se determinaron en base a estudios previos con estos xenobióticos en diferentes especies animales, incluyendo a los quironómidos, así como en el análisis de supervivencia realizado sobre larvas de *C. riparius*, seleccionando aquellas concentraciones que se encontraban por debajo de la concentración letal media (LC50) para cada uno de los tiempos estudiados. De esta forma, los cambios observados pueden relacionarse con los efectos tóxicos primarios de cada uno de los compuestos y no con que las larvas se encuentren en un momento próximo a su muerte, en el que se producen numerosas alteraciones debidas a otros procesos, como la apoptosis, evitando la asociación de los efectos específicos de estos procesos con las alteraciones generales producidas por la exposición a los xenobióticos.

De los tres compuestos estudiados, el TCS fue el más tóxico para las larvas de *C. riparius*, ya que produjo la muerte de la mitad de la población (LC50) a una menor concentración después de 24 horas de tratamiento, seguido por el NP y el BPA, obteniendo unos valores de LC50 de 4, 19 y 55 mg/L, respectivamente. Esta tendencia se mantuvo con los tratamientos de 48, 72 y 96 horas, aunque para el caso del NP y el TCS los valores del LC50 llegan a ser similares en las exposiciones a tiempos largos. El valor del LC50 del NP se encuentra dentro del rango de concentraciones obtenido en otros invertebrados acuáticos, siendo similares a los de la almeja *Tapes philippinarum* (Matozzo y col., 2003), el mejillón *Mytilus edulis* (Granmo y col., 1989) y el berberecho *Cerastoderma glaucum* (Marin y col., 2008), el cual es el más sensible de los cuatro organismos descritos. En cambio, estos resultados difieren con los anteriormente mostrados por Lee y Choi (2006), en los que la población de *C. riparius* de este estudio presentó una mayor susceptibilidad por el NP al obtener un valor del LC50 de 0,7 mg/L. En cuanto al TCS, existen distintos estudios en los que se analiza su efecto sobre la

supervivencia de diferentes invertebrados acuáticos (Orvos y col., 2002; Delorenzo y col., 2008; Dussault y col., 2008; Kim y col., 2009; Perron y col., 2012), revelando nuestros resultados que las larvas acuáticas de *C. riparius* son las más resistentes a la presencia del TCS en el medio, al presentar un LC50 superior a los anteriormente citados. En el caso del BPA el valor del LC50 a 96 horas para la especie *C. tentans* fue de 2,7 mg/L (Mihaich y col., 2009), coincidiendo en cuanto a orden de magnitud con los descritos en este trabajo, de manera similar a los obtenidos tras 48 horas de exposición en *Daphnia magna*, en el que el valor del LC50 es próximo al de *C. riparius* (Alexander y col., 1988). Los tratamientos con BPA en *Hydra vulgaris* mostraron que este organismo es más sensible tras exposiciones de 24 horas, en cambio los resultados del LC50 en exposiciones de 48, 72 y 96 horas para este cnidario se encuentran dentro del rango de concentraciones de *C. riparius* (Pascoe y col., 2002). En conjunto, el estudio de la supervivencia indica que la sensibilidad de *C. riparius* a estos tres compuestos es similar a la de otros organismos acuáticos, reforzando así su idoneidad como especie de referencia en los estudios ecotoxicología.

2.1. Efectos sobre el sistema endocrino

Una de las principales hormonas del sistema endocrino de insectos es la ecdisona, la cual regula los procesos de muda y metamorfosis, esenciales para el desarrollo de los artrópodos. Esta hormona, de naturaleza esteroidea, se une en el interior celular al receptor de ecdisona, un heterodímero formado por las proteínas receptor de ecdisona (EcR) y ultraespiráculo (USP) (Lezzi y col., 1999), que actúa como factor de transcripción. Una vez la hormona activa su receptor se inicia una cascada de expresión génica en la que intervienen otros factores de transcripción y, finalmente, una serie de genes efectores cuyos productos llevan a cabo los cambios en el desarrollo y el avance de la muda y metamorfosis. Dentro de esta cascada se encuentra el gen *E74*, el cual es activado directamente por el receptor de ecdisona y forma parte del conjunto de genes denominados genes de respuesta temprana a ecdisona. El gen *E74* codifica para una proteína que actúa como factor de transcripción activando la expresión de los genes que forman parte de la respuesta tardía a la ecdisona. La unión de la hormona ecdisona a su receptor genera un bucle de respuesta que lleva al incremento de los niveles de EcR (Koelle y col., 1991) al mismo tiempo que se produce la inducción de la expresión de los genes de respuesta temprana a la ecdisona, entre los que se encuentra el *E74*, *E75*, *E93* y *broad* (Koelle y col., 1991; Karim y Thummel, 1992; Yao y col., 1993). En el caso de los quironómidos se ha observado que tras la incubación de células de *C. tentans* con 20-hidroxiectdisona se produce un incremento en los niveles del receptor EcR (Rauch y col., 1998).

Entre los posibles efectos que pueden producirse en los seres vivos como consecuencia de la exposición a los compuestos xenobióticos se encuentra la disrupción endocrina o alteración del

sistema hormonal del organismo. Para evaluar la capacidad disruptora endocrina sobre larvas de *C. riparius* se analizaron los niveles de expresión del ARNm de los genes *EcR*, *usp* y *E74*. A pesar de la importancia de la ruta de respuesta a ecdisona en los insectos, existen otras rutas que podrían verse afectadas por la exposición a los diferentes compuestos químicos. Sin embargo, la falta de información respecto a otras rutas endocrinas en esta especie hace difícil la selección de otros genes para su estudio. Hasta el momento solo se ha descrito otro gen que podría tener relación con el sistema endocrino, el gen del *receptor relacionado con estrógenos (ERR)*. Este gen codifica para un receptor nuclear huérfano, sobre el cual, y a pesar de su parentesco estructural con otros ERs, se desconoce su ligando natural o sintético, aunque los ligandos tanto del ER como del ERR podrían estar estructuralmente relacionados. Esto hace interesante el estudio de los niveles de expresión del ERR para analizar si, de la misma manera que los diferentes compuestos xenobióticos pueden afectar al receptor de ecdisona, pueden modificar el patrón de expresión del ERR, sugiriendo que podrían actuar como ligandos sintéticos.

Para el estudio de los efectos del NP sobre el sistema endocrino de *C. riparius* se analizaron los niveles de expresión de los genes *EcR* y *ERR*. El análisis del comportamiento transcripcional de estos genes mostró que el NP produce un descenso en los niveles de expresión del ARNm de los genes *EcR* y *ERR* tras 24 horas de exposición, recuperando los niveles normales a las 96 horas de tratamiento. Estos datos sugieren que el NP podría actuar alterando el sistema endocrino en este organismo, actuando como antagonista del ligando natural de ambos receptores. En cambio, estos resultados difieren de los presentados en estudios previos en este organismo, en los que describieron que el NP fue capaz de aumentar los niveles del ARNm del gen *EcR* (Nair y Choi, 2012) y del *ERR* (Park y Kwak, 2010) tras exposiciones cortas con este compuesto. Sin embargo, resultados similares al presentado en este trabajo se han descrito para estos genes o sus homólogos en vertebrados e invertebrados por otros EDCs. Hwang y colaboradores (2010) describieron en el copépodo *Tigriopus japonicus* un descenso en la expresión del gen *EcR* tras exposiciones con BPA a tiempos cortos, mientras que tras 48 horas de exposición se recuperaron los niveles de expresión. De igual manera, el di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) fue capaz de reducir los niveles de expresión del gen *EcR* en *C. riparius* (Planelló y col., 2011). En el caso de mamíferos se ha observado que ratones expuestos a NP sufren la inhibición de la expresión del receptor de estrógenos, del receptor de andrógenos y del receptor de progesterona (Liu y col., 2014). El efecto disruptor endocrino del NP se ha descrito en otras especies, tanto de vertebrados como de invertebrados, como indican los estudios realizados en peces (Lech y col., 1996; Gimeno y col., 1997; Tremblay y Van der Kraak, 1998; Yadetie y col., 1999; Naderi y col., 2013; Hanson y col., 2014), en ratas (Soto y col., 1991; Lee y Lee, 1996; Kim y col., 2002; Wu y col., 2008; Xi y col., 2013), en insectos (Atli, 2013; Yuan y col., 2013) y en moluscos (Riva y col., 2010; Liu y col.,

2011; De Lisa y col., 2013). Se desconoce el mecanismo por el cual el NP interfiere con el sistema hormonal, pero su efecto como disruptor endocrino se atribuye a su estructura molecular, ya que es semejante al estradiol (Thiele y col., 1997). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el NP podría actuar como antagonista de la hormona ecdisona, uniéndose a su receptor y disminuyendo el bucle de retroalimentación que lleva a cabo sobre su actividad transcripcional. En el caso del ERR es necesario realizar más estudios para confirmar si la forma de regulación es similar a la descrita anteriormente.

Respecto al TCS, el presente estudio describe, por primera vez, su capacidad de alterar los patrones de expresión de un conjunto de genes implicados en la respuesta temprana de la ruta hormonal de la ecdisona en insectos. Los resultados obtenidos muestran que el TCS induce la expresión de los genes *EcR*, *usp* y *E74*, así como del gen *ERR* en larvas de *C. riparius* a las 24 horas de exposición, recuperando posteriormente los niveles de expresión normales en exposiciones prolongadas. El efecto sobre la expresión de estos genes se detecta incluso a la concentración más baja de TCS estudiada excepto en el caso del gen *EcR*, en el que el efecto se produce a la mayor concentración analizada. Estudios previos han sugerido la capacidad disruptora endocrina del TCS como molécula agonista de estrógenos tanto en cultivos celulares como en diferentes especies de vertebrados. Se ha descrito la capacidad del TCS de inducir la producción de vitelogenina en peces (Ishibashi y col., 2004; Raut y Angus, 2010) y de inhibirla en machos de la rana *Xenopus laevis* (Matsumara y col., 2005) y en *Daphnia magna* (Hannas y col., 2011). Además se ha demostrado que produce efectos tanto estrogénicos como androgénicos en cultivos de células tumorales de mama (Gee y col., 2008), así como la reducción de la actividad transcripcional inducida por testosterona en cultivos celulares humanos (Chen y col., 2007) y la expresión de genes dependientes de estrógenos y andrógenos (Ahn y col., 2008). También se ha descrito que el TCS produce la alteración en la síntesis de la hormona luteinizante, la hormona estimulante del folículo, la prenilona y la testosterona en machos de rata (Kumar y col., 2008, 2009). Por otro lado se han descrito los efectos de este compuesto sobre el sistema tiroideo de anfibios. El TCS presenta una estructura similar a la hormona tiroidea y existen estudios que demuestran su capacidad de alterar procesos mediados por estas hormonas en anfibios, modificando el desarrollo y la metamorfosis en renacuajos (Veldhoen y col., 2006; Fort y col., 2010; Helbing y col., 2010). Los resultados obtenidos en larvas de *C. riparius* tras la exposición con TCS podrían compararse con los descritos previamente en anfibios, en los que el TCS actuaría mimetizando la hormona natural de los receptores nucleares de tiroideas, ya que se ha descrito que el receptor de ecdisona presenta una estructura similar a la del receptor de las hormonas tiroideas (Gilbert, 2000), por lo que podría establecerse un nexo entre los efectos producidos sobre el sistema tiroideo de anfibios con los causados sobre el sistema de la ruta de la ecdisona de este insecto, en la

que el TCS actuaría de forma análoga sobre el receptor de ecdisona. Se ha descrito un comportamiento similar al presentado tras exposiciones con óxido de tributilo de estaño en larvas de *C. riparius* (Morales y col., 2013), en el que se ha demostrado un incremento en los niveles del ARNm de los genes *EcR*, *usp* y *E74*, los cuales son genes clave en la respuesta a ecdisona. Por tanto, una posible explicación del efecto del TCS sobre el EcR es que es capaz de interactuar con el receptor mimetizando el comportamiento de la ecdisona, lo que supone la primera evidencia a nivel molecular del efecto disruptor endocrino del TCS en invertebrados. Por otro lado, el estudio realizado sobre los niveles del ARNm del gen *usp*, como parte del heterodímero del receptor de ecdisona, ha mostrado un incremento de su expresión tras la exposición con TCS, así como se ha observado un aumento de los niveles del transcrito del gen *E74* a la concentración más alta tras 24 horas de exposición con TCS. Estos resultados sugieren que en *C. riparius* se produce un efecto rápido y específico del TCS sobre los genes *EcR* y *usp*. Estos genes transducen y amplifican la señal hormonal mediante la activación de genes de respuesta secundaria, como el *E74*. Además, el TCS es capaz de aumentar la expresión del gen *ERR*, mimetizando el efecto del ligando endógeno, de manera similar a lo descrito en estudios previos en los que se ha descrito un aumento en el transcrito del gen *ERR* tras tratamientos con di(2-etilhexil)ftalato (Park y Kwak, 2010) y con óxido de tributilo de estaño (Morales y col., 2013), lo que apoya que este gen pueda ser considerado como un posible biomarcador ambiental para compuestos disruptores endocrinos.

Uno de los compuestos químicos con capacidad disruptora endocrina más estudiados en la actualidad es el BPA. Por ello, es importante conocer en qué grado las alteraciones en diferentes parámetros relacionados con el desarrollo y la reproducción pueden ser una manifestación de su capacidad disruptora endocrina en *C. riparius*.

El análisis de los niveles del ARNm del gen *EcR* indica que es capaz de activar su expresión tras 48 horas de exposición a 0,5 mg/L de BPA, al igual que ocurre a concentraciones más altas (Planelló y col., 2008), demostrando que puede mimetizar la acción de la hormona ecdisona al producir la sobreexpresión del gen que codifica para su receptor. Se ha sugerido que el BPA actúa como un agonista del estrógeno que puede activar la expresión del gen del receptor de estrógenos en el pez *Oryzias latipes* (Min y col., 2003) y en la rana *Xenopus laevis* (Levy y col., 2004), además de producir un aumento en la síntesis del receptor de andrógenos y de estrógenos en ratones (Richter y col., 2007), así como el receptor de progesterona y de estrógenos en ratas (Funabashi y col., 2001; Wu y col., 2008) y de la hormona tiroidea en anfibios (Iwamuro y col., 2006). Estos resultados sugieren que el gen receptor de ecdisona de *C. riparius*, al igual que otros receptores esteroideos de vertebrados, puede ser modulado por el BPA, sugiriendo una vía común de acción de este compuesto a través de

la interacción con el receptor de hormonas esteroideas, compartido en vertebrados e invertebrados. De igual manera, cuando se evaluaron los niveles de expresión del gen *ERR* se obtuvieron resultados similares a los del gen *EcR*, observando también un aumento de la expresión de este gen a las 48 horas de exposición, aunque no estadísticamente significativo. Sin embargo, al igual que ocurre con el NP, resultados previos han descrito que el BPA es capaz de aumentar la expresión de este gen tras 24 y 96 horas de exposición (Park y Kwak, 2010). Tratamientos experimentales con 17 β -estradiol y octilfenol no produjeron el aumento de expresión del gen *ERR* en el caracol *Marisa cornuarietis*, en cambio, se observó que el BPA podía interaccionar débilmente con el dominio de unión a ligando del ERR, demostrando que podría actuar como un posible ligando de este receptor (Bannister y col., 2013). De manera similar, Takayanagi y colaboradores (2006) describieron que el BPA se unía fuertemente al ERR γ de humanos, por lo que podría mimetizar la acción de su ligando endógeno. Todos estos resultados sugieren que el BPA podría actuar como la hormona ecdisona en *C. riparius*, mimetizando su acción al ser capaz de modular la expresión del gen *EcR*, lo que implicaría una similitud en el mecanismo de acción de este xenobiótico en invertebrados y vertebrados, en los que interacciona con diferentes receptores de hormonas esteroideas.

2.2. Efectos en la respuesta a estrés celular

Las proteínas de choque térmico (HSPs) se encuentran entre las proteínas más conservadas a lo largo de la evolución, estando presentes en todos los seres vivos, desde procariontes a eucariotes. Se encuentran en todos los tipos celulares, tanto en condiciones normales de crecimiento como en condiciones de estrés, ya que desempeñan un papel fundamental en los procesos celulares (Feder y Hoffman, 1999). Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la respuesta de los genes *hsp70* y *hsp27* sobre *C. riparius*, empleado como organismo de referencia recomendado por la OCDE para ensayos de toxicidad, tras las exposiciones a NP, TCS y BPA para analizar si la expresión de ambos genes se regulaba de manera diferente con los tratamientos con estos compuestos. Se ha descrito que la HSP70 se sobreexpresa en respuesta a estrés térmico en *C. riparius* (Morales y col., 2011), aunque también está implicada en otras situaciones de estrés ambiental, entre las que se encuentra la presencia de compuestos tóxicos (Planelló y col., 2010, 2011; Morales y col., 2011, 2013). La HSP27 pertenece a la familia de proteínas de choque térmico de pequeño tamaño (sHSPs), las cuales actúan como chaperonas moleculares para proteger las proteínas de la desnaturalización por alta temperatura, aunque también están implicadas en diferentes procesos biológicos en insectos, como son el crecimiento celular, la apoptosis, la diferenciación, la diapausa, el ciclo de vida, la oxidación, el estrés hipertónico, la fluidez de la membrana y la resistencia a la inanición (Arrigo, 1998; Tsvetkova y col., 2002; Morrow y col., 2004; Hao y col., 2007; Gkouvtis y col., 2008; Li y col., 2009). Además las

sHSPs actúan bajo diferentes condiciones de estrés ambiental, como pueden ser los cambios de temperatura, la radiación ultravioleta, la exposición a metales pesados o la presencia de compuestos tóxicos (Reineke, 2005; Waters y col., 2008).

Como puede observarse en la tabla XX, en la que se resumen los resultados obtenidos entre los dos genes seleccionados, el TCS y el BPA activan la expresión de los genes *hsp70* y *hsp27* en larvas de *C. riparius*. En cambio, el NP produce una modulación diferencial para cada uno de los genes; mientras que las exposiciones con este compuesto disminuyen la expresión del gen *hsp70*, no produce alteraciones sobre los niveles del ARNm del gen *hsp27*.

Tabla XX. Comparación de la expresión de los genes *hsp70* y *hsp27* tras exposiciones con NP, TCS y BPA

	NP	TCS	BPA
<i>hsp70</i>	-	+	+
<i>hsp27</i>	=	+	+*

* Datos no mostrados; + sobreexpresión; - inhibición;
= sin cambios

Los resultados obtenidos indican que el NP reduce los niveles de expresión del ARNm del gen *hsp70* tras exposiciones de 24 y 96 horas. Por el contrario, estudios previos han descrito la capacidad del NP de inducir la síntesis del ARNm del gen *hsp70* en larvas de *C. tentans* y *C. riparius* (Lee y Choi, 2006; Lee y col., 2006; Morales y col., 2011), así como en el pez *Gobius niger* (Maradonna y col., 2009). El gen *hsp70* de *C. tentans* ha sido empleado como una herramienta para la evaluación del estrés ambiental (Karouna-Renier y Zehr, 2003) y se ha descrito un aumento en sus niveles de expresión tras la exposición con diferentes compuestos (Lee y col., 2006). Resultados similares a los obtenidos en este trabajo se han observado después de exposiciones con NP en el copépodo *Tigriopus japonicus* (Rhee y col., 2009), en el que este compuesto produce una fuerte represión de la expresión del gen *hsp70*. Además, se ha descrito en células HeLa que el NP no activa el promotor del gen *hsp70* (Aït-Aïssa y col., 2000). El descenso de la expresión del gen *hsp70* puede deberse a la disminución en la expresión del factor de choque térmico HSF1 (Endo y col., 2014), aunque se desconocen los mecanismos de la represión de este factor. Por otro lado se ha descrito que la rápida degradación del ARNm *hsp70* en células de *D. melanogaster* se debe a una desadenilación inicial del extremo 3' seguido por la eliminación de la caperuza y degradación del extremo 5' (Bönisch y col., 2007). Otra posible explicación para comprender cómo se produce el descenso de la expresión del ARNm del gen *hsp70* es a partir del resultado de un bucle de retroalimentación negativa que implica la inducción de

la proteína HSP70. La proteína HSP70 puede unirse al ARNm *hsp70* como mecanismo para limitar su expresión y reducir los niveles del ARNm (Balakrishnan y De Maio, 2006), lo que podría explicar el aumento de la expresión de este gen tras tratamientos de larvas de *C. riparius* con NP durante 24 horas descrito por Lee y Choi (2006) y los resultados obtenidos, en los que no podría descartarse un pico de inducción a tiempos tempranos seguidos por la inhibición de su expresión.

Hasta la fecha existen muy pocos estudios sobre los efectos del TCS en la respuesta a estrés celular. El TCS activa la expresión del gen *hsp70* en larvas de *C. riparius*. Estos datos coinciden con estudios previos que demuestran que el TCS es capaz de aumentar los niveles del ARNm del gen *hsp70* en cultivos celulares de rata, así como los del gen *hsp30* en renacuajos de *Rana catesbeiana* (Hinthner y col., 2011). Los genes que codifican para las HSPs han adquirido gran importancia y, en concreto, la HSP70 se ha evaluado como posible biomarcador de exposición a diferentes compuestos xenobióticos en diferentes especies de quironómidos, tales como *C. yoshimatsui* (Yoshimi y col., 2002), *C. tentans* (Karouna-Renier y Zehr, 2003), *C. dilutus* (Karouna-Renier y Rao, 2009) y *C. riparius* (Morales y col., 2011). Además de su función en la respuesta a estrés, se ha sugerido que puede existir una relación funcional entre las hormonas esteroideas y las proteínas de choque térmico ya que las proteínas HSP70, HSC70 y HSP90 son componentes del complejo del receptor nuclear de hormonas (Nollen y Morimoto, 2002). En este sentido, se ha descrito el aumento de expresión del gen *hsp70* en *C. riparius* tras el tratamiento con el estrógeno sintético etinilestradiol (Morales y col., 2011), así como su inducción en *Drosophila melanogaster* tras la exposición a ecdisona y en mamíferos con estrógenos (Ryan y Hightower, 1998).

Por otro lado se analizaron los niveles de expresión del gen que codifica para la proteína de choque térmico HSP70 tras exposiciones a diferentes tiempos con BPA. Los resultados obtenidos muestran un aumento de la expresión de dicho gen a las 72 horas de exposición, aunque no estadísticamente significativo. Se ha descrito que el BPA produce un aumento en la expresión del gen *hsp70* en el anfípodo *Gammarus fossarum* (Schirling y col., 2006), así como de diferentes proteínas HSPs en ratones (Papaconstantinou y col., 2002) y en embriones de *Xenopus laevis* (San Segundo y col., 2013). Además se ha observado en el dinoflagelado *Prorocentrum minimum* que exposiciones a concentraciones bajas de BPA producen un aumento de expresión del gen *hsp70* a las 12 horas de exposición (Guo y col., 2012). Estos datos difieren de los obtenidos, en los que se produce un incremento de la expresión a tiempos largos de exposición, frente a los observados en estudios anteriores. Sin embargo, se observaron resultados similares a los presentados en este trabajo tras exposiciones de *C. tentans* con BPA, en los que no se produjo un aumento de la expresión de dicho gen a las 24 horas de exposición (Lee y col., 2006). Estos resultados apoyan el interés del empleo del

gen *hsp70* como un biomarcador de estrés celular, el cual es inducido por metales pesados, EDCs, herbicidas y antibióticos, confirmando datos previos obtenidos en otros estudios y con otras especies de quironómidos (Karouna-Renier y Zehr, 2003; Lee y col., 2006; Planelló y col., 2008, 2010; Karouna-Renier y Rao, 2009; Park y col., 2009, 2010).

Los cambios que se producen a nivel del gen *hsp27* solo se han analizado para el NP y el TCS, observándose que el NP no produce cambios en sus niveles de expresión, mientras que tras el tratamiento con TCS se produce un incremento en los niveles de su ARNm. Se ha descrito que el promotor de la HSP27 presenta un elemento de respuesta a ecdisona (EcRE) en *Ceratitis capitata* (Kokolakis y col., 2008) y en *Drosophila melanogaster* (Riddihough y Pelham, 1987; Ozyhar y Pongs, 1993) y se ha demostrado que la forma activa de la ecdisona, la 20-hidroxiecdisona, regula la expresión del gen *hsp27* en cultivos de glándulas salivares de *Ceratitis capitata* (Kokolakis y col., 2008). Además, se ha descrito la unión del heterodímero EcR/USP al EcRE del gen *hsp27* en *C. tentans* (Elke y col., 1999) y que el EcR actúa como factor de transcripción de las sHSPs en *Drosophila melanogaster* (Amin y col., 1991; Luo y col., 1991; Pakuła y col., 2012). En el caso de vertebrados, se ha relacionado el gen *hsp27* con los niveles de expresión del receptor de estrógenos en mamíferos (Dunn y col., 1993; Bonkhoff y col., 2000). Con todos estos datos, es posible pensar que la inhibición de la expresión del gen *EcR* por el NP es un elemento a tener en cuenta ya que disminuye los niveles de un factor de activación de la expresión del gen *hsp27*, lo que se podría traducir en la inhibición observada. En cambio, el TCS aumenta los niveles del ARNm de los genes *EcR*, *usp*, *E74* y *ERR*, por lo que el EcR podría inducir la expresión del gen *hsp27* al unirse a su promotor. Se han descrito resultados similares tras la exposición con TCS en renacuajos de *Rana catesbeiana*, mostrando la capacidad de este xenobiótico de activar la expresión del gen *hsp30*, perteneciente a la familia sHSP (Hinther y col., 2011), lo que indica que el TCS es capaz de activar la respuesta a estrés celular.

2.3. Efectos sobre el sistema de detoxificación celular

La familia del citocromo P450 de insectos tiene múltiples funciones, aunque todavía se desconoce el papel específico que desempeñan cada una de estas enzimas en los procesos celulares, tanto fisiológicos como toxicológicos. Esto se debe al gran número de genes y a la variedad de funciones de cada una de las proteínas codificadas. Se ha descrito que los insectos tienen el doble de genes *CYP* que los mamíferos, aunque solo un tercio de los que poseen las plantas (Feyereisen, 2005). Muchas proteínas P450 de insectos están implicadas en el metabolismo de compuestos endógenos (ecdiesteroides, hormona juvenil, lípidos, etc.), pero gran parte de sus funciones se asocia con el metabolismo y la detoxificación de xenobióticos (Feyereisen, 1999). Se ha descrito que los genes *CYP* de insectos se inducen por una gran variedad de compuestos químicos (Feyereisen, 2005) y se

relacionan con la resistencia a insecticidas (Ranson y col., 2002), aunque el patrón de respuesta dentro de cada familia y la selectividad de sus inductores tienen que ser definidas para entender el papel de estos genes en la ruta detoxificación de los xenobióticos. Hasta la fecha el conocimiento sobre los citocromos P450 de los quironómidos es muy escaso, a pesar de que estos organismos son ampliamente utilizados en estudios de toxicología acuática (Londoño y col., 2007; Park y col., 2009; Nair y col., 2013b).

Por su parte, la glutatión S-transferasa (GST) es una familia de enzimas implicada en la fase II de los procesos de detoxificación celular. Estas enzimas juegan un importante papel en la detoxificación de compuestos tóxicos tanto endógenos como xenobióticos y están implicadas en el transporte intracelular, en la biosíntesis de hormonas y en la protección contra el estrés oxidativo (Enayati y col., 2005; Xu y col., 2014). En insectos los estudios sobre las GSTs se han centrado en su papel en la resistencia a insecticidas (Enayati y col., 2005) y en la respuesta a estrés oxidativo (Zou y col., 2000).

La exposición a NP produce un descenso inicial de los niveles de expresión del gen *CYP4G* y de la actividad de la GST en larvas de *C. riparius*, recuperándose los niveles normales en exposiciones prolongadas. Estudios previos realizados en ratas describieron que el NP inhibe la expresión y actividad del *CYP1A* (Lee y col., 1996), mientras que en el caso de *C. riparius* se ha descrito que el gen *CYP9AT2* disminuye sus niveles de expresión del ARNm tras 24 horas de exposición a NP (Nair y col., 2013b). Además existen resultados que muestran la reducción de la expresión de diferentes *CYP4* de *Drosophila melanogaster* y *Spodoptera littoralis* tras el tratamiento con los agonistas de ecdiesteroides RH-5849 (1,2 dibenzoil-1-terc-butilhidrazina) y RH-5992 (tebufenozida) respectivamente (Davies y col., 2006). Igualmente, se ha descrito la capacidad del NP de reducir la expresión de proteínas P450 en *Salmo salar* (Arukwe y col., 2000) y en *Gobius niger* (Maradonna y col., 2004). A la vista de estos datos, nuestros resultados confirman la sensibilidad a la inhibición de diferentes componentes de la familia del citocromo P450, por lo que el NP parece ser un inhibidor efectivo general, sugiriendo que existe un mecanismo de acción común a todos ellos.

Los resultados obtenidos en este trabajo tras el análisis de la actividad de la GST también siguen la línea observada en estudios previos, en los que se han descrito la capacidad del NP de inhibir la actividad de diferentes enzimas antioxidantes en rata (Chitra y col., 2002), así como la actividad de la GST en lubina (Huges y Gallager, 2004). La bioacumulación y los efectos adversos observados en el hígado de truchas arcoíris tratadas con NP se asociaron con el descenso de la actividad de la GST (Uguz y col., 2003). De igual manera, se ha observado que cuando se trataron machos de lubina con la hormona natural 17 β -estradiol se produjo un descenso de la actividad enzimática de la GST, aunque cuando se expusieron a NP no se produjo ningún efecto sobre su actividad enzimática

(Vaccaro y col., 2005). En el caso de *C. riparius*, y a diferencia de los resultados presentados en este trabajo, se ha descrito un aumento de la actividad enzimática de la GST tras exposiciones a NP (Lee y Choi, 2006). Por otro lado, la presencia de NP también produce la alteración de la actividad de la catalasa, aunque los datos son contradictorios, ya que se ha descrito tanto su inhibición (Park y Choi, 2009) como su activación (Lee y Choi, 2006), por lo que se necesitan más estudios para conocer los cambios que produce este compuesto sobre el sistema de detoxificación.

Sin embargo, la exposición a TCS no altera la expresión del gen *CYP4G* ni de la actividad enzimática de la GST en las condiciones analizadas. Estos resultados difieren con otros estudios en los que se ha demostrado la capacidad del TCS de activar la expresión de los genes *CYP1A*, *CYP3A* y *GST*, así como un aumento de la actividad enzimática de la GST en el pez *Xiphophorus helleri* (Liang y col., 2013), al igual que en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, en el que las exposiciones a TCS produjeron un aumento de la actividad de la GST (Canesi y col., 2007b). Por el contrario, estudios en *Daphnia magna* han descrito que el TCS produce la inhibición de la expresión de diferentes citocromos P450 pero no altera la actividad enzimática de la GST en exposiciones de 24 y 48 horas (Peng y col., 2013). Por otro lado, se ha descrito un aumento en los niveles de expresión de diferentes citocromos P450 en rata (Paul y col., 2010a, 2010b, 2012), así como un incremento en la expresión del gen *CYP1A* y en la actividad enzimática de *CYP1A* y *CYP3A4* tras exposiciones con TCS en cultivos de células humanas (Rudzok y col., 2009; Paul y col., 2013). Sin embargo, exposiciones con TCS en ratas no alteraron los niveles de expresión del gen *CYP1A1* y se produjo una respuesta diferente en la expresión de las enzimas glucuroniltransferasa y sulfotransferasa, implicadas en la fase II del sistema de detoxificación (Paul y col., 2010a, 2010b). Los resultados muestran que el TCS afecta de manera diferente a distintas enzimas implicadas en el sistema de detoxificación, tanto de la fase I como de la fase II, por lo que resultaría interesante realizar estudios futuros de otros citocromos P450 y otras actividades enzimáticas para obtener un modelo más completo sobre los efectos de este compuesto en los diferentes procesos de detoxificación celular.

A pesar de la importancia de conocer los efectos del BPA en la biota de los ecosistemas acuáticos, es muy poco conocida su interacción con el sistema de detoxificación celular. La expresión del gen *CYP4G* tras exposiciones a BPA muestra un descenso de los niveles del ARNm de dicho gen a las 24 horas, recuperando valores similares a los de larvas no tratadas a partir de las 48 horas. Resultados similares se han descrito recientemente tras exposiciones con BPA a larvas de *C. riparius*, en las que se observó un descenso de expresión del *CYP9AT2* tras 24 horas (Nair y col., 2013b). De manera similar se ha demostrado que las exposiciones a BPA inhiben las enzimas *CYP2* y *CYP3* en hígado de rata (Hanioka y col., 2000) y que la inhibición de la expresión del gen *CYP1A1* en ratones está

mediada directamente por el BPA (Jeong y col., 2000). Además, exposiciones con BPA en cultivos de células humanas produjeron la represión de la expresión del ARNm del gen *CYP19* (Huang y Leung, 2009), así como de la actividad de diferentes citocromos P450 (Niwa y col., 2001). Estos resultados muestran la capacidad del BPA de inhibir la expresión y la actividad de diferentes citocromos P450 sobre diferentes sistemas animales y celulares, coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo empleando como organismo de referencia larvas de *C. riparius*.

El análisis de la fase II del sistema de detoxificación mediante la actividad enzimática de la GST mostró que el BPA produce una inhibición de su actividad tras 24 horas de exposición, recuperando niveles similares a los de larvas no tratadas a partir de las 48 horas de exposición. Resultados similares se han descrito tras exposiciones con cadmio y partículas de plata en larvas de *C. riparius*, las cuales provocan un descenso en los niveles de expresión de diferentes genes *GST* (Nair y Choi, 2011). Resultados opuestos se obtuvieron cuando se expuso *Daphnia magna* a BPA ya que tras tratamientos de 24 horas se produjo un incremento de la actividad enzimática de la GST, mientras que en exposiciones crónicas de 21 días disminuyó su actividad (Jemec y col., 2012). De manera similar sucede con lo descrito en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, donde se ha descrito un aumento en la actividad de la GST tras tratamientos con BPA (Canesi y col., 2007a), así como en embriones de rata, en los que se produce un aumento en el ARNm del gen *GST* en diferentes órganos (Nishizawa y col., 2005), y en el turón europeo *Mustela putorius* (Nieminen y col., 2002). Al contrario que en el caso del citocromo P450, la respuesta de la GST a la exposición con BPA es diferente dependiendo de la especie animal analizada.

2.4. Efectos genotóxicos

Una propiedad que podría relacionar los efectos endocrinos y genéticos en especies expuestas a contaminantes EDCs es la genotoxicidad (Iso y col., 2006). El análisis del daño inducido en el ADN mediante el ensayo cometa tras la exposición de larvas de *C. riparius* a NP, TCS y BPA reveló que los tres xenobióticos provocan roturas en el ADN como indican todos los parámetros analizados, demostrando así su capacidad genotóxica. Además, los resultados obtenidos confirman que el ensayo cometa es una aproximación rápida y sensible para evaluar los efectos genotóxicos de compuestos xenobióticos en *C. riparius*. Hasta la fecha pocos estudios han evaluado la genotoxicidad de compuestos disruptores endocrinos, particularmente en invertebrados, a pesar de que la genotoxicidad se considera como uno de los marcadores más importantes cuando se valora el riesgo ambiental de los compuestos químicos.

La capacidad genotóxica del NP se encuentra actualmente en discusión tras haberse obtenido conclusiones opuestas empleando diferentes organismos y diferentes ensayos. Aunque puede afectar a otros parámetros tóxicos, el NP no parece afectar a la integridad del ADN en peces (Rivero y col., 2008) ni en *Daphnia magna* (Park y Choi, 2009) ni tampoco incrementa los micronúcleos en ratón ni las aberraciones cromosómicas en *Allium cepa* (Grisolia y col., 2004). Por el contrario, se ha demostrado en estudios *in vitro* que produce daño en el ADN en el bivalvo *Scrobularia plana*, aunque solo a altas concentraciones (Petridis y col., 2009). Conclusiones similares se obtuvieron en el caso de células CHO-K1, donde este xenobiótico provocó roturas en el ADN, cambios de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas (Tayama y col., 2008). En el caso de *C. riparius* los resultados obtenidos confirman que el NP produce daño en el ADN, coincidiendo con resultados previos en los que se analizaba su capacidad genotóxica a corto plazo (Park y Choi, 2009). El efecto genotóxico producido por el NP es dependiente de la concentración en las exposiciones a 24 horas, mientras que a las 96 horas de tratamiento se observa una disminución significativa del daño, lo que sugiere la activación de los mecanismos de reparación, que serían capaces de compensar el daño producido por el NP no acumulándose a lo largo del tiempo. La comparación de los diferentes parámetros empleados para el análisis del daño en el ADN entre los diferentes tiempos estudiados muestra que a la concentración más baja hay un aumento estadísticamente significativo de la longitud de la cola y del momento cola en exposiciones de 96 horas, mientras que el porcentaje de ADN en cola y el momento oliva se mantienen en niveles similares, por lo que se puede deducir que se producen fragmentos de ADN más pequeños con el paso del tiempo, aunque se mantienen los niveles de daño total. Sin embargo, a las concentraciones más altas de NP hay una reducción de todos los parámetros del ensayo cometa analizados, indicando que hay una disminución del daño genotóxico total y un aumento del tamaño de los fragmentos más pequeños producidos, sugiriendo la activación de los mecanismos de reparación del ADN. Aunque con los datos obtenidos no es posible determinar el mecanismo de acción del NP como compuesto genotóxico, se han propuesto dos posibles vías. Por un lado puede producirse por un aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS) a las 24 horas de exposición ya que se ha descrito que el NP produce estrés oxidativo al ser capaz de aumentar la actividad enzimática de la catalasa tras 24 horas de exposición (Lee y Choi, 2006), además de observarse un aumento de la expresión del ARNm de este gen a las 24 horas de exposición, pero no a las 12, 48 ni 72 horas (Nair y col., 2011a). Por otro lado, también se ha descrito que el NP produce la oxidación de los nucleótidos de guanina, por lo que podría además producir un efecto directo sobre el ADN (Karadeniz y col., 2010). Para determinar el mecanismo por el cual el NP actúa es necesario realizar más estudios, aunque es posible afirmar que tiene un efecto genotóxico que, aparentemente, no es lo suficientemente fuerte como para superar la capacidad del mecanismo de reparación del ADN de la célula.

Los estudios de la genotoxicidad del TCS sobre organismos acuáticos son escasos y los resultados obtenidos en este trabajo suponen la primera evidencia del potencial genotóxico de este xenobiótico en invertebrados de agua dulce. El análisis de la actividad genotóxica del TCS sobre células de *C. riparius* muestra que existe una relación entre el daño en el ADN y la concentración, de tal manera que a mayor concentración del producto se produce un aumento del efecto genotóxico. Por otro lado, y a diferencia de lo ocurrido con el NP, no hay una tendencia a la recuperación en todas las concentraciones, sino que a las concentraciones más altas de TCS existe un aumento del daño, por lo que es probable que los mecanismos de reparación no sean capaces de compensar el daño en el ADN producido por este xenobiótico. El análisis de los resultados de los diferentes parámetros del ensayo cometa tras las exposiciones de 24 y 96 horas muestra que a la menor concentración de TCS hay una reducción de todos ellos tras el tratamiento de 96 horas, lo que indica que hay una reducción del daño total en el ADN y un aumento del tamaño de los fragmentos de ADN producidos, sugiriendo que se está produciendo la reparación del daño genético producido por el TCS. En cambio a la concentración de 100 µg/L tras exposiciones de 96 horas se produce un incremento del tamaño de los fragmentos de ADN al reducirse la longitud de la cola, mientras que a la concentración de 1000 µg/L aumentan todos los parámetros analizados excepto la longitud de la cola tras exposiciones de 96 horas, por lo que está aumentando el daño total en el ADN, pero no varía el tamaño del fragmento más pequeño del ADN. Estos resultados sugieren que los mecanismos de reparación no son capaces de contrarrestar los efectos del TCS sobre el genoma a las concentraciones más altas. La comparación de estos resultados con los obtenidos con el NP permite considerar que el TCS presenta una mayor capacidad genotóxica, ya que los mecanismos de reparación no compensan su efecto a largo plazo. De esta forma, el TCS puede tener una mayor incidencia en la viabilidad de la población.

Se han descrito previamente efectos genotóxicos del TCS en el invertebrado *Dreissena polymorpha*, tanto *in vitro* como *in vivo*, probablemente producido por la combinación del estrés oxidativo y/o del efecto directo sobre el ADN (Binelli y col., 2009a, 2009b), así como en el alga *Closterium ehrenbergii*, en la cual produce además la inhibición de la reproducción sexual (Ciniglia y col., 2005). En la actualidad no existen datos sobre los efectos genotóxicos del TCS en los seres humanos, pero hay estudios que han demostrado su genotoxicidad en diferentes líneas celulares animales (Jirasripongpun y col., 2008). En cuanto al modo de acción, se ha sugerido una posible relación entre el daño en el ADN y el estrés oxidativo y la producción de ROS, que conducen al daño y a la muerte celular. Lin y colaboradores (2012) describieron que tras exposiciones a concentraciones bajas de TCS se produjo un aumento de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), lo que mostraba que inducía la producción de O_2^- . En cambio, a concentraciones altas se produjo la inhibición de esta enzima, sugiriendo que el sistema de defensa antioxidante podría estar dañado. Resultados similares

se obtuvieron cuando se estudió la enzima catalasa, en la que se observó un aumento de la actividad a concentraciones bajas de TCS, mientras que a altas no se produjo un aumento de la misma. Estos resultados muestran que SOD y la catalasa actúan de manera sincronizada, ya que SOD transforma O_2^- en H_2O_2 y el H_2O_2 es catalizado por la catalasa, por lo que a concentraciones altas de TCS no se eliminan las especies reactivas del oxígeno que son capaces, entre otras cosas, de producir daño sobre el ADN (Lin y col., 2012). Además se observó un aumento de los niveles de malondialdehído, un indicador de la producción de ROS. A partir de estos resultados se ha relacionado el daño en el ADN en *Eisenia fetida* con el estrés oxidativo y la consiguiente producción de ROS tras exposiciones con TCS (Lin y col., 2012). De manera similar, se ha descrito que el TCS incrementa la actividad de la SOD en el caracol *Achatina fulica*, mientras que la actividad de la catalasa parecía dependiente de concentración, ya que a bajas concentraciones aumentaba su actividad enzimática y a concentraciones elevadas disminuía (Wang y col., 2014). El O_2^- puede actuar como un agente oxidante o reductor produciendo efectos deletéreos sobre el ADN, ARN y proteínas (Harris y col., 1980; Fridovich, 1983; Rzeuski y col., 1998). Es de esperar que futuros estudios puedan establecer si el mecanismo por el que el TCS provoca daño en el ADN es similar en todos los organismos.

El análisis del potencial genotóxico del BPA en *C. riparius* confirma los resultados obtenidos en otros estudios. Aunque este xenobiótico produjo daño en el ADN en todas las condiciones estudiadas, el efecto fue diferente en función del tiempo de exposición. Mientras que a la concentración más alta no hay diferencias en los parámetros analizados entre los tratamientos de 24 y 96 horas, a la concentración más baja todos los parámetros se redujeron, indicando un aumento en el tamaño de los fragmentos de ADN y una disminución del daño total. Estos resultados sugieren que únicamente a la menor concentración de BPA los mecanismos de reparación de ADN son capaces de compensar el daño genotóxico producido por el compuesto, mientras que esto no parece ocurrir a la concentración más alta, ya sea porque estos mecanismos son inactivados o porque el daño es tal que no son capaces de compensarlo. Estos son los primeros datos que apoyan la hipótesis de la activación de mecanismos de reparación de ADN tras exposiciones prolongadas a BPA, lo cual está de acuerdo con el incremento observado en la expresión de genes implicados en la reparación del ADN en células epiteliales mamarias humanas (Fernandez y col., 2012). De igual forma que ocurre con el NP, la capacidad genotóxica del BPA es controvertida a pesar de que este compuesto ha sido objeto de especial atención debido a su amplia distribución y a los posibles efectos que podría causar sobre la salud humana. Se ha descrito que el BPA, al igual que el 17 β -estradiol, causa daño en el ADN mediado por el receptor de estrógenos (Iso y col., 2006). Estudios previos *in vitro* mostraron que el tratamiento con BPA en células tumorales de mama produjo poco daño en el ADN (Quinn-Hosey y col., 2012). Además se han descrito efectos genotóxicos del BPA *in vitro* en células humanas HeLa y

con exposiciones *in vivo* en *Daphnia magna* y *C. tentans* (Park y Choi, 2007). También se ha demostrado la capacidad genotóxica en ratas, en las que el BPA induce micronúcleos y aberraciones cromosómicas, además de provocar roturas en el ADN detectadas mediante ensayo cometa (Tiwari y col., 2012). En cuanto al modo de acción, experimentos recientes han sugerido que el BPA podría inducir acumulación de daño en el ADN en células germinales de rata a través de estrés oxidativo, a la vez que hay un descenso en la actividad SOD, la cual puede ser contrarrestada por melatonina, ya que actúa como un potente antioxidante (Wu y col., 2013). Por lo tanto, es posible que también en este caso el daño en el ADN se produzca a través de un mecanismo indirecto que implique la formación de radicales libres.

Un aspecto novedoso de este trabajo fue la comparación del daño en el ADN entre las exposiciones de 24 y de 96 horas. Los análisis de genotoxicidad, particularmente mediante el ensayo cometa, se realizan normalmente durante las primeras horas de exposición al tóxico, ya que se conoce que el daño genético ocurre inmediatamente después de la adición del compuesto tóxico y frecuentemente solo se analiza en un único tiempo. Los datos obtenidos en este trabajo revelan que las exposiciones persistentes no siempre incrementan el daño en el ADN, sino que a veces se produce una reducción del mismo, mostrando una tendencia a recuperar la situación normal. Como se ha descrito, las exposiciones largas con NP y con las concentraciones más bajas de BPA y TCS mostraron una disminución del daño genotóxico cuando se compararon con los resultados de exposiciones cortas. La evaluación del daño total en el ADN es el balance entre dos fuerzas opuestas, por un lado la producción de roturas en el ADN por los agentes genotóxicos y por otro la eliminación de las lesiones mediante la maquinaria de reparación del ADN. Los resultados presentados sugieren que durante exposiciones prolongadas con los xenobióticos se puede inducir la activación de mecanismos de reparación y/o detoxificación celular para hacer frente a las lesiones en el ADN a largo plazo, que de otra manera podrían comprometer la supervivencia celular. Esta hipótesis podría coincidir con el aumento de la expresión del gen *CYP4G* y/o de la actividad enzimática de la GST en los tratamientos prolongados con NP y BPA. Aunque es necesario profundizar más en estos estudios, es posible especular con la existencia de una relación entre la reducción del daño en el ADN y la activación de las enzimas de la fase I y fase II del sistema de detoxificación, las cuales sirven como la principal defensa celular contra los efectos tóxicos de los xenobióticos. Esta hipótesis se apoya en estudios previos en los que se demuestra el incremento de los efectos genotóxicos con la disminución de los niveles de GSH en células humanas (Kumpawat y col., 2003). De manera similar se ha observado en diferentes especies de mejillones una disminución del daño en el ADN a las dos horas de retirar del medio el compuesto pentaclorofenol (Villela y col., 2006), así como a la hora de eliminar del medio diferentes compuestos fenólicos (Labieniec y col., 2007), por lo que el aumento de la expresión del

gen *CYP4G* y/o de la actividad enzimática de la GST podría asemejarse a la retirada del compuesto del medio.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo suponen un avance en la comprensión de los mecanismos de acción del nonilfenol, el triclosán y el bisfenol A a nivel molecular, bioquímico y celular en un organismo de referencia como es *Chironomus riparius*. Además, abren nuevas cuestiones merecedoras de ser estudiadas y aportan nuevas herramientas para el análisis de la toxicidad en esta especie. Estudios futuros podrán permitir completar el cuadro que se ha comenzado a esbozar y, de esta manera, mejorar nuestra relación con el medio en el que vivimos y comprender en toda su extensión el efecto que nuestras acciones tienen sobre el mismo.

CONCLUSIONES

- Se ha caracterizado el transcrito del citocromo P450 de la familia 4 subfamilia G (CYP4G) de *Chironomus riparius*. Este gen presenta un único intrón de 63 pb y la proteína para la que codifica tiene 559 aminoácidos y presenta los dominios característicos de la familia del citocromo P450 monooxigenasa, un elemento estructural característico de la familia 4 y una región típica de la subfamilia G.
- Se ha descrito por primera vez una proteína de choque térmico de pequeño tamaño (sHSP) en *C. riparius*, la HSP27. La secuencia de nucleótidos del gen *hsp27* no presenta intrones y la proteína contiene 195 aminoácidos. Posee tres regiones conservadas con los homólogos de la HSP27 de otros dípteros, además del dominio α -cristalino, característico de las sHSPs. Asimismo, el análisis de la estructura tridimensional del dominio α -cristalino indica que está altamente conservado en todas las sHSPs de este organismo.
- El gen *EcR* de *C. riparius* contiene cuatro intrones en su región codificante, característica común con los genes *EcR* de otras especies de insectos. La proteína EcR tiene un tamaño de 539 aminoácidos y presenta el dominio de unión a ADN y el dominio de unión a ligando, característicos de la superfamilia de receptores de esteroides, los cuales muestran una alta identidad de secuencia cuando se compara con otros dípteros. Además se encuentran otros tres dominios conservados en las proteínas EcR de insectos.
- Las larvas de *C. riparius* presentan diferente sensibilidad frente a los tres compuestos estudiados, siendo el triclosán (TCS) el compuesto que más mortalidad produce seguido por el nonilfenol (NP) y el bisfenol A (BPA). Esta tendencia se mantiene en todos los tiempos estudiados.
- Las exposiciones a concentraciones no letales de NP, TCS y BPA modulan la expresión de diferentes genes implicados en el sistema endocrino de *C. riparius*. Se demuestra de esta forma la capacidad disruptora endocrina de estos xenobióticos en invertebrados, mimetizando los eventos celulares desencadenados por las hormonas esteroideas en insectos, lo que puede implicar importantes alteraciones en el desarrollo del organismo. Por otro lado, y a pesar de las diferencias entre los sistemas endocrinos de vertebrados e invertebrados, los resultados obtenidos apoyan la existencia de un mecanismo de acción común de los EDCs mediado por receptores.
- El presente estudio ha demostrado un efecto modulador de los compuestos NP, TCS y BPA en la expresión de los genes *hsp70* y *hsp27* de *C. riparius*, sugiriendo que ambos genes podrían ser biomarcadores específicos, rápidos y sensibles para la evaluación de compuestos

químicos en ensayos de ecotoxicología, ya que han mostrado una susceptibilidad diferente frente a los diferentes compuestos tóxicos.

- El gen *CYP4G* y la enzima GST pueden ser buenos biomarcadores para el análisis de la respuesta en los invertebrados acuáticos a la presencia de compuestos químicos en el ambiente. Tras exposiciones con NP, TCS y BPA ambos marcadores se modulan de manera diferente y selectiva para cada uno de los xenobióticos estudiados. La correlación observada entre los efectos sobre el gen *CYP4G* y sobre la actividad de la GST permite evaluar el sistema de detoxificación celular en su conjunto.
- Los tres xenobióticos estudiados muestran capacidad genotóxica, demostrando que algunos EDCs son capaces de producir lesiones en el ADN. La disminución del daño en el ADN en las exposiciones a tiempos largos sugiere una respuesta mediante la activación de los mecanismos de reparación del ADN y/o del sistema de detoxificación celular. Los resultados obtenidos sugieren la necesidad de realizar estudios adicionales que asocien la actividad genotóxica de estos compuestos con otras respuestas biológicas, los cuales pueden proporcionar una mayor comprensión de los efectos adversos de estas sustancias en el medio ambiente.
- El desarrollo de nuevas metodologías hacen de *Chironomus riparius* un organismo modelo idóneo para los estudios de ecotoxicología en invertebrados acuáticos, ya que permite la aproximación *in vivo* de los efectos a nivel molecular, bioquímico y celular de EDCs presentes en los ecosistemas acuáticos.

BIBLIOGRAFÍA

Adolfsson-Erici M, Pettersson M, Parkkonen J, Sturve J (2002). Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere*. 46(9-10): 1485-1489.

Ahn KC, Zhao B, Chen J, Cherednichenko G, Sanmarti E, Denison MS, Lasley B, Pessah IN, Kültz D, Chang DPY, Gee SJ, Hammock BD (2008). *In vitro* biologic activities of the antimicrobials triclocarban, its analogs, and triclosan in bioassay screens: receptor-based bioassay screens. *Environmental Health Perspectives*. 116(9): 1203-1210.

Aït-Aïssa S, Porcher J, Arrigo A, Lambré C (2000). Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology*. 145(2-3): 147-157.

Al-Shami SA, Rawi CS, Ahmad AH, Nor SA (2012). Genotoxicity of heavy metals to the larvae of *Chironomus kiiensis* Tokunaga after short-term exposure. *Toxicology and Industrial Health*. 28(8): 734-739.

Alexander HC, Dill DC, Smith LW, Guiney PD, Dorn P (1988). Bisphenol A: acute aquatic toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 7(1): 19-26.

Allmyr M, Adolfsson-Erici M, McLachlan MS, Sandborgh-Englund G (2006). Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. *Science of the Total Environment*. 372(1): 87-93.

Allmyr M, Harden F, Toms LM, Mueller JF, McLachlan MS, Adolfsson-Erici M, Sandborgh-Englund G (2008). The influence of age and gender on triclosan concentrations in Australian human blood serum. *Science of the Total Environment*. 393(1): 162-167.

Amin J, Mestrlil R, Voellmy R (1991). Genes for *Drosophila* small heat shock proteins are regulated differently by ecdysterone. *Molecular and Cellular Biology*. 11(12): 5937-5944.

Andersen HR, Halling-Sørensen B, Kusk KO (1999). A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology and Environmental safety*. 44(1): 56-61.

Anderson RL (1977). Chironomidae toxicity tests - Biological background and procedures. En: Buikema AL, Cairns J (Eds.). *Aquatic Invertebrate Bioassays*. American Society for Testing and Materials (ASTM). Baltimore.

Anderson TD, Jin-Clark Y, Begum K, Starkey SR, Zhu KY (2008). Gene expression profiling reveals decreased expression of two hemoglobin genes associated with increased consumption of oxygen in *Chironomus tentans* exposed to atrazine: a possible mechanism for adapting to oxygen deficiency. *Aquatic Toxicology*. 86(2): 148-156.

Arambourou H, Beisel JN, Branchu P, Debat V (2012). Patterns of fluctuating asymmetry and shape variation in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) exposed to nonylphenol or lead. *PLoS One*. 7(11): e48844.

Armstrong RN (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*. 10(1): 2-18.

Arrigo AP (1998). Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biological Chemistry*. 379(1): 19-26.

Arukwe A, Celius T, Walther BT, Goksøyr A (2000). Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*. 49(3): 159-170.

Ashburner M, Chihara C, Meltzer P, Richards G (1974). Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 38: 655-662.

Ashburner M, Richards G (1976). The role of ecdysone in the control of gene activity in the polytene chromosomes of *Drosophila*. En: Lawrence PA (Ed.). *Insect Development*. John Wiley and Sons. Nueva York.

ASTM (2006). Standard test methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Book of Standards Vol. 11.06. American Society for Testing Materials. Philadelphia.

Atli E (2013). The effects of three selected endocrine disrupting chemicals on the fecundity of fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 91(4): 433-437.

Balakrishnan K, De Maio A (2006). Heat shock protein 70 binds its own messenger ribonucleic acid as part of a gene expression self-limiting mechanism. *Cell Stress and Chaperones*. 11(1): 44-50.

Bannister R, Beresford N, Granger DW, Pounds NA, Rand-Weaver M, White R, Jobling S, Routledge EJ (2013). No substantial changes in estrogen receptor and estrogen-related receptor orthologue gene

transcription in *Marisa cornuarietis* exposed to estrogenic chemicals. *Aquatic Toxicology*. 140-141: 19-26.

Benkert P, Biasini M, Schwede T (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*. 27(3): 343-350.

Berg MB, Hellenthal RA (1992). The role of Chironomidae in energy flow of a lotic ecosystem. *Aquatic Ecology*. 26(2-4): 471-476.

Berger EM, Goudie K, Klieper L, Berger M, DeCato R (1992). The juvenile hormone analogue, methoprene inhibits ecdysterone induction of small heat shock protein gene expression. *Developmental Biology*. 151(2): 410-418.

Bester K (2003). Triclosan in a sewage treatment process-balances and monitoring data. *Water Research*. 37(16): 3891-3896.

Bester K (2005). Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 49(1): 9-17.

Bettinetti R, Cuccato D, Galassi S, Provini A (2002). Toxicity of 4-nonylphenol in spiked sediment to three populations of *Chironomus riparius*. *Chemosphere*. 46(2): 201-207.

Bettinetti R, Provini A (2002). Toxicity of 4-nonylphenol to *Tubifex tubifex* and *Chironomus riparius* in 28-day whole-sediment tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 53(1): 113-121.

Bhattacharyay G, Sadhu AK, Mazumdar A, Chaudhuri PK (2005). Antennal deformities of chironomid larvae and their use in biomonitoring of heavy metal pollutants in the river Damodar of West Bengal, India. *Environmental Monitoring and Assessment*. 108(1-3): 67-84.

Binelli A, Cogni D, Parolini M, Riva C, Provini A (2009a). *In vivo* experiments for the evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of triclosan in zebra mussel hemocytes. *Aquatic Toxicology*. 91(3): 238-244.

Binelli A, Cogni D, Parolini M, Riva C, Provini A (2009b). Cytotoxic and genotoxic effects of *in vitro* exposure to triclosan and trimethoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 150(1): 50-56.

Blackburn MA, Waldock MJ (1995). Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Research*. 29(7): 1623-1629.

Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermiin LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrnyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *Journal of Biological Chemistry*. 275(32): 24798-24806.

Bönisch C, Temme C, Moritz B, Wahle E (2007). Degradation of hsp70 and other mRNAs in *Drosophila* via the 5' 3' pathway and its regulation by heat shock. *Journal of Biological Chemistry*. 282(30): 21818-21828.

Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K (2000). Estrogen receptor gene expression and its relation to the estrogen-inducible HSP27 heat shock protein in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*. 45(1): 36-41.

Bonneton F, Zelus D, Iwema T, Robinson-Rechavi M, Laudet V (2003). Rapid divergence of the ecdysone receptor in Diptera and Lepidoptera suggests coevolution between ECR and USP-RXR. *Molecular Biology and Evolution*. 20(4): 541-553.

Borden KL, Freemont PS (1996). The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Current Opinion in Structural Biology*. 6(3): 395-401.

Bradfield JY, Lee YH, Keeley LL (1991). Cytochrome P450 family 4 in a cockroach: molecular cloning and regulation by hypertrehalosemic hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88(10): 4558-4562.

Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C (2000). Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome C. *Nature Cell Biology*. 2(9): 645-652.

Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL (2008). Urinary concentrations of triclosan in the US population: 2003-2004. *Environmental Health Perspectives*. 116(3): 303-307.

Canesi L, Borghi C, Ciacci C, Fabbri R, Vergani L, Gallo G (2007a). Bisphenol-A alters gene expression and functional parameters in molluscan hepatopancreas. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 276(1-2): 36-44.

- Canesi L, Ciacci C, Lorusso LC, Betti M, Gallo G, Pojana G, Marcomini A (2007b). Effects of triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities: possible modes of action on non target organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 145(3): 464-472.
- Caspers GJ, Leunissen JA, de Jong WW (1995). The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain". *Journal of Molecular Evolution*. 40(3): 238-248.
- CEPA 1999 (2001). Priority substances list assessment report; Nonylphenol and its Ethoxylates. Canadian Environmental Protection Act.
- Chen S, Zhou D, Yang C, Sherman M (2001). Molecular basis for the constitutive activity of estrogen-related receptor α -1. *Journal of Biological Chemistry*. 276(30): 28465-28470.
- Chen J, Ahn KC, Gee NA, Gee SJ, Hammock BD, Lasley BL (2007). Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 221(3): 278-284.
- Cherednichenko G, Zhang R, Bannister RA, Timofeyev V, Li N, Fritsch EB, Feng W, Barrientos GC, Schebb NH, Hammock BD, Beam KG, Chiamvimonvat N, Pessah IN (2012). Triclosan impairs excitation-contraction coupling and Ca^{2+} dynamics in striated muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(35): 14158-14163.
- Chelvanayagam G, Parker MW, Board PG (2001). Fly fishing for GSTs: a unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. *Chemico-Biological Interactions*. 133(1-3): 256-260.
- Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP (2002). Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats. *Archives of Toxicology*. 76(9): 545-551.
- Cho WL, Kapitskaya MZ, Raikhel AS (1995). Mosquito ecdysteroid receptor: analysis of the cDNA and expression during vitellogenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 25(1): 19-27.
- Chothia C, Lesk AM (1986). The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO Journal*. 5(4): 823-826.
- Ciniglia C, Cascone C, Giudice RL, Pinto G, Pollio A (2005). Application of methods for assessing the geno- and cytotoxicity of triclosan to *C. ehrenbergii*. *Journal of Hazardous Materials*. 122(3): 227-232.

- Cox C (1996). Nonylphenol and related chemicals. *Journal of Pesticide Reform*. 16(1): 15-20.
- Crain DA, Eriksen M, Iguchi T, Jobling S, Laufer H, LeBlanc GA, Guillette LJ Jr (2007). An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology*. 24(2): 225-239.
- Datkhile KD, Mukhopadhyaya R, Dongre TK, Nath BB (2009). Increased level of superoxide dismutase (SOD) activity in larvae of *Chironomus ramosus* (Diptera: Chironomidae) subjected to ionizing radiation. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology, Pharmacology and Endocrinology*. 149(4): 500-506.
- Davies L, Williams DR, Aguiar-Santana IA, Pedersen J, Turner PC, Rees HH (2006). Expression and down-regulation of cytochrome P450 genes of the CYP4 family by ecdysteroid agonists in *Spodoptera littoralis* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36(10): 801-807.
- de Bisthoven LJ, Vermeulen A, Ollevier F (1998). Experimental induction of morphological deformities in *Chironomus riparius* larvae by chronic exposure to copper and lead. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 35(2): 249-256.
- de Bisthoven LJ, Postma J, Vermeulen A, Goemans G, Ollevier F (2001). Morphological deformities in *Chironomus riparius* Meigen larvae after exposure to cadmium over several generations. *Water, Air and Soil Pollution*. 129(1-4): 167-179.
- de Jong WW, Leunissen JA, Voorter CE (1993). Evolution of the alpha-crystallin/small heat-shock protein family. *Molecular Biology and Evolution*. 10(1): 103-126.
- de Jong WW, Caspers GJ, Leunissen JA (1998). Genealogy of the alpha-crystallin - small heat-shock protein superfamily. *International Journal of Biological Macromolecules*. 22(3-4): 151-162.
- De Lisa E, Carella F, De Vico G, Di Cosmo A (2013). The gonadotropin releasing hormone (GnRH)-like molecule in prosobranch *Patella caerulea*: potential biomarker of endocrine-disrupting compounds in marine environments. *Zoological Science*. 30(2): 135-140.
- Delorenzo ME, Keller JM, Arthur CD, Finnegan MC, Harper HE, Winder VL, Zdankiewicz DL (2008). Toxicity of the antimicrobial compound triclosan and formation of the metabolite methyl-triclosan in estuarine systems. *Environmental Toxicology*. 23(2): 224-232.

Denlinger DL, Rinehart JP, Yocum GD (2001). Stress proteins: a role in insect diapause? En: Denlinger DL, Giebultowicz J, Saunders DS (Eds.). *Insect timing: Circadian rhythmicity to seasonality*. Elsevier. Amsterdam.

Depledge MH (1998). The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutation Research*. 399(1): 109-122.

Ding Y, Ortellì F, Rossiter LC, Hemingway J, Ranson H (2003). The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics*. 4(1): 35.

Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.

Directiva 2003/53/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 18 de junio de 2003 por la que se modifica por vigesimosexta vez la Directiva 76/769/CEE del Consejo respecto a la limitación de la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (nonilfenol, etoxilatos de nonilfenol y cemento).

Directiva 2011/8/UE de la Comisión de 28 de enero de 2011 que modifica la Directiva 2002/72/CE por lo que se refiere a la restricción del uso de bisfenol A en biberones de plástico para lactantes.

Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas.

Domingues I, Guilhermino L, Soares AM, Nogueira AJ, Monaghan KA (2009). Influence of exposure scenario on pesticide toxicity in the midge *Kiefferulus calligaster* (Kieffer). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72(2): 450-457.

Duft M, Schulte-Oehlmann U, Weltje L, Tillmann M, Oehlmann J (2003). Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquatic Toxicology*. 64(4): 437-449.

Dunn DK, Whelan RD, Hill B, King RJ (1993). Relationship of HSP27 and oestrogen receptor in hormone sensitive and insensitive cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 46(4): 469-479.

Dussault EB, Balakrishnan VK, Sverko E, Solomon KR, Sibley PK (2008). Toxicity of human pharmaceuticals and personal care products to benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27(2): 425-432.

Eaton DL, Bammler TK (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences*. 49(2): 156-164.

Ehrnsperger M, Gaestel M, Buchner J (1997a). Structure and function of small heat shock proteins. En: Fink AL, Goto Y (Eds.). *Molecular chaperones in the life cycle of proteins. Structure, function and mode of action*. Marcell Dekker. Nueva York.

Ehrnsperger M, Gräber S, Gaestel M, Buchner J (1997b). Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO Journal*. 16(2): 221-229.

Elke C, Rauch P, Spindler-Barth M, Spindler KD (1999). DNA-binding properties of the ecdysteroid receptor-complex (EcR/USP) of the epithelial cell line from *Chironomus tentans*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 41(3): 124-133.

Enayati AA, Ranson H, Hemingway J (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*. 14(1): 3-8.

Endo H, Yano M, Okumura Y, Kido H (2014). Ibuprofen enhances the anticancer activity of cisplatin in lung cancer cells by inhibiting the heat shock protein 70. *Cell Death and Disease*. 5: e1027.

Evans RM (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 240(4854): 889-895.

Feder ME, Hofmann GE (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*. 61: 243-282.

Fernandez SV, Huang Y, Snider KE, Zhou Y, Pogash TJ, Russo J (2012). Expression and DNA methylation changes in human breast epithelial cells after bisphenol A exposure. *International Journal of Oncology*. 41(1): 369-377.

Feyereisen R (1999). Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology*. 44: 507-533.

Feyereisen R (2005). Insect cytochrome P450. En: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS (Eds.). *Comprehensive molecular insect science*. Elsevier. Ámsterdam.

- Feyereisen R (2006). Evolution of insect P450. *Biochemical Society Transactions*. 34(6): 1252-1255.
- Fisher TC, Crane M, Callaghan A (2000). An optimized microtiterplate assay to detect acetylcholinesterase activity in individual *Chironomus riparius* Meigen. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19(7): 1749-1752.
- Fort DJ, Rogers RL, Gorsuch JW, Navarro LT, Peter R, Plautz JR (2010). Triclosan and anuran metamorphosis: no effect on thyroid-mediated metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Toxicological Sciences*. 113(2): 392-400.
- Fridovich I (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 23: 239-257.
- Fu X, Li W, Mao Q, Chang Z (2003). Disulfide bonds convert small heat shock protein Hsp16.3 from a chaperone to a non-chaperone: implications for evolution of cysteine in molecular chaperones. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 308(3): 627-635.
- Funabashi T, Kawaguchi M, Kimura F (2001). The endocrine disrupters butyl benzyl phthalate and bisphenol A increase the expression of progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the preoptic area of adult ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*. 74(2): 77-81.
- Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Chauffert B, Mehlen P (1997). HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Research*. 57(13): 2661-2667.
- Gaume B, Bourgougnon N, Auzoux-Bordenave S, Roig B, Le Bot B, Bedoux G (2012). *In vitro* effects of triclosan and methyl-triclosan on the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 156(2): 87-94.
- Gee RH, Charles A, Taylor N, Darbre PD (2008). Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. *Journal of Applied Toxicology*. 28(1): 78-91.
- Giguère V, Yang N, Segui P, Evans RM (1988). Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature*. 331(6151): 91-94.
- Giguère V (2002). To ERR in the estrogen pathway. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 13(5): 220-225.

Gilbert SF (2000). Metamorphosis, regeneration and aging. En: Gilbert SF (Ed.). Developmental biology. Sinauer Associates. Sunderland.

Gilbert LI, Rybczynski R, Warren JT (2002). Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. Annual Review of Entomology. 47: 883-916.

Gilbert LI, Warren JT (2005). A molecular genetic approach to the biosynthesis of the insect steroid molting hormone. Vitamins and Hormones. 73: 31-57.

Gimeno S, Komen H, Venderbosch PWM, Bowmer T (1997). Disruption of sexual differentiation in genetic male common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to an alkylphenol during different life stages. Environmental Science and Technology. 31(10): 2884-2890.

Gkouvitass T, Kontogiannatos D, Kourti A (2008). Differential expression of two small Hsps during diapause in the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* (Lef.). Journal of Insect Physiology. 54(12): 1503-1510.

Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y (1989). Evolution, structure, and gene regulation of cytochrome P-450. En: Ruckpaul K, Rein H (Eds.). Frontiers in biotransformation Vol. 1. Taylor y Francis. Nueva York.

Granmo A, Ekelund R, Magnusson K, Berggren M (1989). Lethal and sublethal toxicity of 4-nonylphenol to the common mussel (*Mytilus edulis* L.). Environmental Pollution. 59(2): 115-127.

Green S, Chambon P (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. Trends in Genetics. 4(11): 309-314.

Grisolia CK, Bilich MR, Formigli LM (2004). A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonylphenol ethoxylate. Ecotoxicology and Environmental Safety. 59(1): 123-126.

Guittard E, Blais C, Maria A, Parvy JP, Pasricha S, Lumb C, Lafont R, Daborn PJ, Dauphin-Villemant C (2011). CYP18A1, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. Developmental Biology. 349(1): 35-45.

Guo R, Ebenezer V, Ki JS (2012). Transcriptional responses of heat shock protein 70 (Hsp70) to thermal, bisphenol A, and copper stresses in the dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. Chemosphere. 89(5): 512-520.

- Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra RK, Chowdhuri DK (2010). Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sciences*. 86(11-12): 377-384.
- Gusev O, Nakahara Y, Vanyagina V, Malutina L, Cornette R, Sakashita T, Hamada N, Kikawada T, Kobayashi Y, Okuda T (2010). Anhydrobiosis-associated nuclear DNA damage and repair in the sleeping chironomid: linkage with radioresistance. *PLoS One*. 5(11): e14008.
- Ha MH, Choi J (2008a). Chemical-induced alteration of hemoglobin expression in the 4th instar larvae of *Chironomus tentans* Mg. (Diptera: Chironomidae). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 25(3): 393-398.
- Ha MH, Choi J (2008b). Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae of aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): a potential biomarker for ecotoxicity monitoring. *Chemosphere*. 71(10): 1928-1936.
- Hahn T, Schenk K, Schulz R (2002). Environmental chemicals with known endocrine potential affect yolk protein content in the aquatic insect *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution*. 120(3): 525-528.
- Hale RC, Smith CL, De Fur PO, Harvey E, Bush EO, La Guardia MJ, Vadas GG (2000). Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19(4): 946-952.
- Han EH, Hwang YP, Kim HG, Park JH, Jeong TC, Jeong HG (2010). Upregulation of cyclooxygenase-2 by 4-nonylphenol is mediated through the cyclic amp response element activation pathway. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*. 73(21-22): 1451-1464.
- Hanioka N, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Nishimura T, Ando M (2000). Interaction of bisphenol A with rat hepatic cytochrome P450 enzymes. *Chemosphere*. 41(7): 973-978.
- Hannan GN, Hill RJ (1997). Cloning and characterization of LcEcR: a functional ecdysone receptor from the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 27(6): 479-488.
- Hannas BR, Wang YH, Thomson S, Kwon G, Li H, Leblanc GA (2011). Regulation and dysregulation of vitellogenin mRNA accumulation in daphnids (*Daphnia magna*). *Aquatic Toxicology*. 101(2): 351-357.
- Hanson AM, Kittilson JD, Martin LE, Sheridan MA (2014). Environmental estrogens inhibit growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by modulating the growth hormone-insulin-like growth factor system. *General and Comparative Endocrinology*. 196: 130-138.

Hao X, Zhang S, Timakov B, Zhang P (2007). The Hsp27 gene is not required for *Drosophila* development but its activity is associated with starvation resistance. *Cell Stress and Chaperones*. 12(4): 364-372.

Harris JI, Auffret AD, Northrop FD, Walker JE (1980). Structural comparisons of superoxide dismutases. *European Journal of Biochemistry / FEBS*. 106(1): 297-303.

Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*. 295(5561): 1852-1858.

Hasemann CA, Kurumbail RG, Boddupalli SS, Peterson JA, Deisenhofer J (1995). Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure*. 3(1): 41-62.

Hayes JD, Pulford DJ (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 30(6): 445-600.

Hayes JD, McLellan LI (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research*. 31(4): 273-300.

He H, Xi G, Lu X (2010). Molecular cloning, characterization, and expression analysis of an estrogen receptor-related receptor homologue in the cricket, *Teleogryllus emma*. *Journal of Insect Science*. 10(188): 1-16.

Heidler J, Halden RU (2007). Mass balance assessment of triclosan removal during conventional sewage treatment. *Chemosphere*. 66(2): 362-369.

Helbing CC, van Aggelen G, Veldhoen N (2010). Triclosan affects thyroid hormone-dependent metamorphosis in anurans. *Toxicological Sciences*. 119(2): 417-418.

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*. 8(2): R19.

Hinther A, Bromba CM, Wulff JE, Helbing CC (2011). Effects of triclocarban, triclosan and methyl triclosan on thyroid hormone action and stress in frog and mammalian culture systems. *Environmental Science and Technology*. 45(12): 5395-5402.

Hong H, Yang L, Stallcup MR (1999). Hormone-independent transcriptional activation and coactivator binding by novel orphan nuclear receptor ERR3. *Journal of Biological Chemistry*. 274(32): 22618-22626.

Huang H, Leung LK (2009). Bisphenol A downregulates CYP19 transcription in JEG-3 cells. *Toxicology Letters*. 189(3): 248-252.

Huges EM, Gallager EP (2004). Effects of 17-B estradiol and 4-nonylphenol on phase II electrophilic detoxification pathways in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 137(3): 237-247.

Huot J, Houle F, Spitz DR, Landry J (1996). HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Research*. 56(2): 273-279.

Huot J, Houle F, Marceau F, Landry J (1997). Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circulation Research*. 80(3): 383-392.

Hwang DS, Lee JS, Lee KW, Rhee JS, Han J, Lee J, Park GS, Lee YM, Lee JS (2010). Cloning and expression of ecdysone receptor (EcR) from the intertidal copepod, *Tigriopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 151(3): 303-312.

IPCS (2002). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. International Programme on Chemical Safety (World Health Organization). Ginebra.

Ishibashi H, Matsumura N, Hirano M, Matsuoka M, Shiratsuchi H, Ishibashi Y, Takao Y, Arizono K (2004). Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquatic Toxicology*. 67(2): 167-179.

Iso T, Watanabe T, Iwamoto T, Shimamoto A, Furuichi Y (2006). DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 29(2): 206-210.

Iwamuro S, Yamada M, Kato M, Kikuyama S (2006). Effects of bisphenol A on thyroid hormone-dependent up-regulation of thyroid hormone receptor alpha and beta and down-regulation of retinoid X receptor gamma in *Xenopus* tail culture. *Life Sciences*. 79(23): 2165-2171.

Izumi N, Yanagibori R, Shigeno S, Sajiki J (2008). Effects of bisphenol A on the development, growth, and sex ratio of the housefly *Musca domestica*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27(6): 1343-1353.

Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry*. 268(3): 1517-1520.

Jakobsson PJ, Mancini JA, Ford-Hutchinson AW (1996). Identification and characterization of a novel human microsomal glutathione S-transferase with leukotriene C4 synthase activity and significant sequence identity to 5-lipoxygenase-activating protein and leukotriene C4 synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 271(36): 22203-22210.

Jemec A, Tišler T, Erjavec B, Pintar A (2012). Antioxidant responses and whole-organism changes in *Daphnia magna* acutely and chronically exposed to endocrine disruptor bisphenol A. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 86: 213-218.

Jeong HG, Kimand JY, Choi CY (2000). Down-regulation of murine Cyp1a-1 in mouse hepatoma Hepa-1c1c7 cells by bisphenol A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 277(3): 594-598.

Jha AN (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*. 23(3): 207-221.

Jirasripongpun K, Wongarethornkul T, Mulliganavin S (2008). Risk assessment of triclosan using animal cell lines. *Kasetsart Journal - Natural Science*. 42(2): 353-359.

Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner AP, Tyler CR (2004). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology*. 66(2): 207-222.

Kahl MD, Makynen EA, Kosian PA, Ankley GT (1997). Toxicity of 4-nonylphenol in a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 38(2): 155-160.

Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*. 39(3 Pt. 2): 499-509.

Kang JH, Aasi D, Katayama Y (2007). Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Critical Reviews in Toxicology*. 37(7): 607-625.

Karadeniz H, Caliskan A, Uguz C (2010). Electrochemical monitoring of the interaction between 4-nonylphenol and DNA by graphite and carbon nanotube modified graphite electrodes. *Analytical Sciences*. 26(10): 1065-1069.

Karim FD, Thummel CS (1992). Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. *EMBO Journal*. 11(11): 4083-4093.

Karouna-Renier NK, Zehr JP (2003). Short-term exposures to chronically toxic copper concentrations induce HSP70 proteins in midge larvae (*Chironomus tentans*). *Science of the Total Environment*. 312(1-3): 267-272.

Karouna-Renier NK, Rao KR (2009). An inducible HSP70 gene from the midge *Chironomus dilutus*: characterization and transcription profile under environmental stress. *Insect Molecular Biology*. 18(1): 87-96.

Kayser H, Winkler T, Spindler-Barth M (1997). 26-hydroxylation of ecdysteroids is catalyzed by a typical cytochrome P-450-dependent oxidase and related to ecdysteroid resistance in an insect cell line. *European Journal of Biochemistry / FEBS*. 248(3): 707-716.

Kim HS, Shin JH, Moon HJ, Kang IH, Kim TS, Kim IY, Seok JH, Pyo MY, Han SY (2002). Comparative estrogenic effects of p-nonylphenol by 3-day uterotrophic assay and female pubertal onset assay. *Reproductive Toxicology*. 16(3): 259-268.

Kim JW, Ishibashi H, Yamauchi R, Ichikawa N, Takao Y, Hirano M, Koga M, Arizono K (2009). Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *Journal of Toxicological Sciences*. 34(2): 227-232.

Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Hartl FU (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual Review of Biochemistry*. 82: 323-55.

Koelle MR, Talbot WS, Segraves WA, Bender MT, Cherbas P, Hogness DS (1991). The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell*. 67(1): 59-77.

Kokolakis G, Tatari M, Zacharopoulou A, Mintzas AC (2008). The *hsp27* gene of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*: structural characterization, regulation and developmental expression. *Insect Molecular Biology*. 17(6): 699-710.

Kooijman SALM (2000). *Dynamic energy and mass budgets in biological systems*. Cambridge University Press. Cambridge.

Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P (1986). The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO Journal*. 5(5): 891-789.

Kumar V, Balomajumder C, Roy P (2008). Disruption of LH-induced testosterone biosynthesis in testicular Leydig cells by triclosan: probable mechanism of action. *Toxicology*. 250(2-3): 124-131.

Kumar V, Chakraborty A, Kural MR, Roy P (2009). Alteration of testicular steroidogenesis and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan. *Reproductive Toxicology*. 27(2): 177-185.

Kumpawat K, Deb S, Ray S, Chatterjee A (2003). Genotoxic effect of raw betel-nut extract in relation to endogenous glutathione levels and its mechanism of action in mammalian cells. *Mutation Research*. 538(1-2): 1-12.

Labieniec M, Biernat M, Gabryelak T (2007). Response of digestive gland cells of freshwater mussel *Unio tumidus* to phenolic compound exposure *in vivo*. *Cell Biology International*. 31(7): 683-690.

Lakind JS, Naiman DQ (2011). Daily intake of bisphenol A and potential sources of exposure: 2005-2006 National Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 21(3): 272-279.

Landry J, Chrétien P, Lambert H, Hickey E, Weber LA (1989). Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *Journal of Cell Biology*. 109(1): 7-15.

Langer-Safer PR, Levine M, Ward DC (1982). Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 79(14): 4381-4385.

Laudet V (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: Early diversification from an ancestral orphan receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*. 19(3): 207-226.

Lavado R, Thibaut R, Raldúa D, Martín R, Porte C (2004). First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro river. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 196(2): 247-257.

Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Landry J (1993). Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *Journal of Biological Chemistry*. 268(32): 24210-24214.

Lavoie JN, Lambert H, Hickey E, Weber LA, Landry J (1995). Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Molecular and Cellular Biology*. 15(1): 505-516.

Le Goff G, Hilliou F, Siegfried BD, Boundy S, Wajnberg E, Sofer L, Audant P, French-Constant RH, Feyereisen R (2006). Xenobiotic response in *Drosophila melanogaster*: sex dependence of P450 and GST gene induction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36(8): 674-682.

Lech JJ, Lewis SK, Ren L (1996). *In vivo* estrogenic activity of nonylphenol in rainbow trout. *Fundamental and Applied Toxicology*. 30(2): 229-232.

Lee PC, Lee W (1996). *In vivo* estrogenic action of nonylphenol in immature female rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 57(3): 341-348.

Lee PC, Patra SC, Stelloh CT, Lee W, Struve M (1996). Interaction of nonylphenol and hepatic CYP1A in rats. *Biochemical Pharmacology*. 52(6): 885-889.

Lee RF, Steinert S, Nakayama K, Oshima Y (1999). Use of DNA strand damage (comet assay) and embryo hatching defects to assess contaminant exposure in blue crab (*Callinectes sapidus*) embryos. En: Henshel DS, Black MC, Harrass MC (Eds.). *Environmental toxicology and risk assessment: standardization of biomarkers for endocrine disruption and environmental assessment Vol. 8*. American Society for Testing and Materials (ASTM). West Conshohocken.

Lee RF, Steinert S (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*. 544(1): 43-64.

Lee SB, Choi J (2006). Multilevel evaluation of nonylphenol toxicity in fourth-instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25(11): 3006-3014.

Lee SM, Lee SB, Park CH, Choi J (2006). Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere*. 65(6): 1074-1081.

Lee SW, Park K, Hong J, Choi J (2008). Ecotoxicological evaluation of octachlorostyrene in fourth instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27(5): 1118-1127.

Leroux MR, Ma BJ, Batelier G, Melki R, Candido EPM (1997a). Unique structural features of a novel class of small heat shock proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 272(2): 12847-12853.

Leroux MR, Melki R, Gordon B, Batelier G, Candido EPM (1997b). Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *Journal of Biological Chemistry*. 272(39): 24646-24656.

Levy G, Lutz I, Krüger A, Kloas W (2004). Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environmental Research*. 94(1): 102-111.

Lezzi M, Bergman T, Mouillet JF, Henrich VC (1999). The ecdysone receptor puzzle. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 41(2): 99-106.

Li ZW, Li X, Yu QY, Xiang ZH, Kishino H, Zhang Z (2009). The small heat shock protein (sHSP) genes in the silkworm, *Bombyx mori*, and comparative analysis with other insect sHSP genes. *BMC Evolutionary Biology*. 9: 215.

Li J, Ma M, Wang Z (2010). *In vitro* profiling of endocrine disrupting effects of phenols. *Toxicology in vitro*. 24(1): 201-207.

Liang P, Amons R, Clegg JS, MacRae TH (1997). Molecular characterization of a small heat shock/alpha-crystallin protein in encysted *Artemia* embryos. *Journal of Biological Chemistry*. 272(30): 19051-19058.

Liang X, Nie X, Ying G, An T, Li K (2013). Assessment of toxic effects of triclosan on the swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) by a multi-biomarker approach. *Chemosphere*. 90(3): 1281-1288.

Lin D, Xie X, Zhou Q, Liu Y (2012). Biochemical and genotoxic effect of triclosan on earthworms (*Eisenia fetida*) using contact and soil tests. *Environmental Toxicology*. 27(7): 385-392.

Liu Y, Tam NF, Guan Y, Yasojima M, Zhou J, Gao B (2011). Acute toxicity of nonylphenols and bisphenol A to the embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Ecotoxicology*. 20(6): 1233-1245.

Liu Z, Xi D, Kang M, Guo X, Xu B (2012). Molecular cloning and characterization of Hsp27.6: the first reported small heat shock protein from *Apis cerana cerana*. *Cell Stress and Chaperones*. 17(5): 539-551.

Liu X, Nie S, Huang D, Xie M (2014). Effects of nonylphenol exposure on expression of cell receptors and secretory function in mouse Sertoli TM4 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 37(2): 608-616.

Londoño DK, Siqueira HAA, Wang H, Sarath G, Lydy MJ, Siegfried BD (2007). Cloning and expression of an atrazine inducible cytochrome p450, CYP4G33, from *Chironomus tentans* (Diptera Chironomidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 89(2): 104-110.

Luo Y, Amin J, Voellmy R (1991). Ecdysterone receptor is a sequence-specific transcription factor involved in the developmental regulation of heat shock genes. *Molecular and Cellular Biology*. 11(7): 3660-3675.

MacRae TH (2000). Structure and function of small heat shock/ α -crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57(6): 899-913.

Maksymowych AB, Hsu TC, Litwack, G. (1992). A novel, highly conserved structural motif is present in all members of the steroid receptor superfamily. *Receptor*. 2(4): 225-240.

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 83(6): 835-839.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1990). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York.

Maradonna F, Polzonetti V, Bandiera SM, Migliarini B, Carnevali O (2004). Modulation of the hepatic CYP1A1 system in the marine fish *Gobius niger*, exposed to xenobiotic compounds. *Environmental Science and Technology*. 38(23): 6277-6282.

Maradonna F, Batti S, Marino M, Mita DG, Carnevali O (2009). Tamoxifen as an emerging endocrine disruptor. Effects on fish reproduction and detoxification target genes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1163: 457-459.

Marin MG, Rigato S, Ricciardi F, Matozzo V (2008). Lethal and estrogenic effects of 4-nonylphenol in the cockle *Cerastoderma glaucum*. *Marine Pollution Bulletin*. 57(6-12): 552-558.

Martinez EA, Moore BC, Schaumlöffel J, Dasgupta N (2004). Teratogenic versus mutagenic abnormalities in chironomid larvae exposed to zinc and lead. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 47(2): 193-198.

Martínez-Guitarte JL, Planelló R, Morcillo G (2007). Characterization and expression during development and under environmental stress of the genes encoding ribosomal proteins L11 and L13 in *Chironomus riparius*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*. 147(4): 590-596.

Matozzo V, Deppieri M, Moschino V, Marin MG (2003). Evaluation of 4-nonylphenol toxicity in the clam *Tapes philippinarum*. *Environmental Research*. 91(3): 179-185.

Matozzo V, Formenti A, Donadello G, Marin MG (2012). A multi-biomarker approach to assess effects of triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine Environmental Research*. 74: 40-46.

Matsumura N, Ishibashi H, Hirano M, Nagao Y, Watanabe N, Shiratsuchi H, Kai T, Nishimura T, Kashiwagi A, Arizono K (2005). Effects of nonylphenol and triclosan on production of plasma vitellogenin and testosterone in male South African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 28(9): 1748-1751.

Mayer MP, Bukau B (2005). Hsp70 chaperones: cellular function and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62(6): 670-684.

McCarthy JF, Shugart LR (1990). *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Publication. Boca Ratón.

Mehlen P, Preville X, Chareyron P, Briolay J, Klemenz R, Arrigo AP (1995). Constitutive expression of human hsp27, *Drosophila* hsp27, or human alpha B-crystallin confers resistance to TNF- and oxidative stress-induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *Journal of Immunology*. 154(1): 363-374.

Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo AP (1996). Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*. 271(28): 16510-16514.

Mercea P (2009). Physicochemical processes involved in migration of bisphenol A from polycarbonate. *Journal of Applied Polymer Science*. 112(2): 579-593.

Meregalli G, Ollevier F (2001). Exposure of *Chironomus riparius* larvae to 17- α -ethynylestradiol: effects on survival and mouthpart deformities. *Science of the Total Environment*. 269(1-3): 157-161.

Meregalli G, Pluymers L, Ollevier F (2001). Induction of mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to 4-n-nonylphenol. *Environmental Pollution*. 111(2): 241-246.

Michail X, Kontogiannatos D, Syriou V, Kourti A (2012). Bisphenol-A affects the developmental progression and expression of heat-shock protein genes in the moth *Sesamia nonagrioides*. *Ecotoxicology*. 21(8): 2244-2253.

Michałowicz J (2014). Bisphenol A - Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 37(2): 738-758.

Mihaich EM, Friederich U, Caspers N, Hall AT, Klecka GM, Dimond SS, Staples CA, Ortego LS, Hentges SG (2009). Acute and chronic toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72(5): 1392-1399.

Min J, Lee SK, Gu MB (2003). Effects of endocrine disrupting chemicals on distinct expression patterns of estrogen receptor, cytochrome P450 aromatase and p53 genes in *Oryzias latipes* liver. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 17(5): 272-277.

Molina-Molina JM, Hillenweck A, Jouanin I, Zalko D, Cravedi JP, Fernández MF, Pillon A, Nicolas JC, Olea N, Balaguer P (2006). Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 216(1): 44-54.

Morales M, Planelló R, Martínez-Paz P, Herrero O, Cortés E, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2011). Characterization of *Hsp70* gene in *Chironomus riparius*: expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology, Pharmacology and Endocrinology*. 153(1): 150-158.

Morales M, Martínez-Paz P, Ozáez I, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2013). DNA damage and transcriptional changes induced by tributyltin (TBT) after short *in vivo* exposures of *Chironomus riparius* (Diptera) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology, Pharmacology and Endocrinology*. 158(2): 57-63.

Morrow G, Battistini S, Zhang P, Tanguay RM (2004). Decreased lifespan in the absence of expression of the mitochondrial small heat shock protein Hsp22 in *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry*. 279(42): 43382-43385.

Naderi M, Zargham D, Asadi A, Bashti T, Kamayi K (2013). Short-term responses of selected endocrine parameters in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to 4-nonylphenol. *Toxicology and Industrial Health*. doi: 10.1177/0748233713491806.

Nair PM, Choi J (2011). Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathione S-transferase (GST) genes in response to cadmium and silver nanoparticles exposure. *Aquatic Toxicology*. 101(3-4): 550-560.

Nair PM, Park SY, Choi J (2011a). Expression of catalase and glutathione S-transferase genes in *Chironomus riparius* on exposure to cadmium and nonylphenol. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology, Pharmacology and Endocrinology*. 154(4): 399-408.

Nair PM, Park SY, Lee SW, Choi J (2011b). Differential expression of ribosomal protein gene, gonadotrophin releasing hormone gene and Balbiani ring protein gene in silver nanoparticles exposed *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology*. 101(1): 31-37.

Nair PM, Choi J (2012). Modulation in the mRNA expression of ecdysone receptor gene in aquatic midge, *Chironomus riparius* upon exposure to nonylphenol and silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 33(1): 98-106.

Nair PM, Park SY, Choi J (2013a). Evaluation of the effect of silver nanoparticles and silver ions using stress responsive gene expression in *Chironomus riparius*. *Chemosphere*. 92(5): 592-599.

Nair PM, Park SY, Choi J (2013b). Characterization and expression of cytochrome p450 cDNA (CYP9AT2) in *Chironomus riparius* fourth instar larvae exposed to multiple xenobiotics. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 36(3): 1133-1140.

Nair PM, Park SY, Chung JW, Choi J (2013c). Transcriptional regulation of glutathione biosynthesis genes, γ -glutamyl-cysteine ligase and glutathione synthetase in response to cadmium and nonylphenol in *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 36(2): 265-273.

Nakada N, Yasojima M, Okayasu Y, Komori K, Suzuki Y (2010). Mass balance analysis of triclosan, diethyltoluamide, crotamiton and carbamazepine in sewage treatment plants. *Water Science and Technology*. 61(7): 1739-1747.

Nam SH, Seo YM, Kim MG (2010). Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*. 79(9): 949-952.

National Research Council (US) (2007). Applications of toxicogenomic technologies to predictive toxicology and risk assessment. The National Academies Press. Washington DC.

Nelson DR (1999). Cytochrome P450 and the individuality of species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 369(1): 1-10.

Neumann NF, Galvez F (2002). DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology? *Biotechnology Advances*. 20(5-6): 391-419.

Nieminen P, Lindström-Seppä P, Juntunen M, Asikainen J, Mustonen AM, Karonen SL, Mussalo-Rauhamaa H, Kukkonen JV (2002). *In vivo* effects of bisphenol A on the polecat (*Mustela putorius*). *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*. 65(13): 933-945.

Nishihara T, Nishikawa J, Kanayama T, Dakeyama F, Saito K, Imagawa M, Takatori S, Kitagawa Y, Hori S, Utsumi H (2000). Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *Journal of Health Science*. 46(4): 282-298.

Nishizawa H, Imanishi S, Manabe N (2005). Effects of exposure in utero to bisphenol a on the expression of aryl hydrocarbon receptor, related factors, and xenobiotic metabolizing enzymes in murine embryos. *Journal of Reproduction and Development*. 51(5): 593-605.

Niwa T, Fujimoto M, Kishimoto K, Yabusaki Y, Ishibashi F, Katagiri M (2001). Metabolism and interaction of bisphenol A in human hepatic cytochrome P450 and steroidogenic CYP17. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 24(9): 1064-1067.

Nollen EA, Morimoto RI (2002). Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell Science*. 115(Pt. 14): 2809-2816.

O'Connor JC, Chapin RE (2003). Critical evaluation of observed adverse effects of endocrine active substances on reproduction and development, the immune system, and the nervous system. *Pure and Applied Chemistry*. 75(11-12): 2099-2123.

OCDE (2004). Guideline for testing of chemicals, sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment. Test No. 218. Organization for Economic Co-operation and Development. París.

OCDE (2006a). Detailed review paper on aquatic arthropods in life cycle toxicity test with an emphasis on developmental, reproductive and endocrine disruptive effects. Series on Testing and Assessment No. 55. Organization for Economic Co-operation and Development. París.

OCDE (2006b). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment No. 54. Organization for Economic Co-operation and Development. París.

OCDE (2011). OECD guideline for the testing of chemicals, section 2. *Chironomus sp.*, acute immobilisation test. Test No. 235. Organization for Economic Co-operation and Development. París.

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B (2000). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology*. 9(6): 383-397.

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Bachmann J, Oetken M, Lutz I, Kloas W, Ternes TA (2006). Bisphenol A induces superfeminization in the ramshorn snail *Marisa cornuarietis* (Gastropoda: Prosobranchia) at environmentally relevant concentrations. *Environmental Health Perspectives*. 114(Supl. 1): 127-133.

Ortiz de Montellano PR, Graham-Lorence SE (1993). Structure of cytochrome P450: heme-binding site and heme reactivity. En: Schenkman JB, Greim H (Eds.). *Cytochrome P450*. Springer. Berlín.

Orvos DR, Versteeg DJ, Inauen J, Capdevielle M, Rothenstein A, Cunningham V (2002). Aquatic toxicity of triclosan. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21(7): 1338-1349.

OSPAR Convention (2000). PARCOM recommendation 92/8 on nonylphenol-ethoxylates. Londres.

Ouyang XH, Xi GS, Bu CP, Wang HL, Zhan GJ, Hong F (2009). Molecular cloning and expression of an estrogen receptor-related receptor gene in the ant *Polyrhachis vicina* (Hymenoptera: Formicidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 102(2): 295-302.

Ozáez I, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2013). Effects of *in vivo* exposure to UV filters (4-MBC, OMC, BP-3, 4-HB, OC, OD-PABA) on endocrine signaling genes in the insect *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment*. 456-457: 120-126.

Ozyhar A, Pongs O (1993). Mutational analysis of the interaction between ecdysteroid receptor and its response element. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 46(2): 135-145.

Pakuła S, Orłowski M, Rymarczyk G, Krusiński T, Jakób M, Zoglowek A, Ozyhar A, Dobryszyccki P (2012). Conformational changes in the DNA-binding domains of the ecdysteroid receptor during the formation of a complex with the hsp27 response element. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 30(4): 379-393.

Papaconstantinou AD, Fisher BR, Umbreit TH, Brown KM (2002). Increases in mouse uterine heat shock protein levels are a sensitive and specific response to uterotrophic agents. *Environmental Health Perspectives*. 110(12): 1207-1212.

Park SY, Choi J (2007). Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. *Environment International*. 33(6): 817-822.

Park K, Kwak IS (2008). Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: effects of di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. *Chemosphere*. 74(1): 89-95.

Park K, Bang HW, Park J, Kwak IS (2009). Ecotoxicological multilevel-evaluation of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae. *Chemosphere*. 77(3): 359-367.

Park SY, Choi J (2009). Genotoxic effects of nonylphenol and bisphenol A exposure in aquatic biomonitoring species: freshwater crustacean, *Daphnia magna*, and aquatic midge, *Chironomus riparius*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 83(4): 463-468.

Park CJ, Kang HS, Gye MC (2010). Effects of nonylphenol on early embryonic development, pigmentation and 3,5,3'-triiodothyronine-induced metamorphosis in *Bombina orientalis* (Amphibia: Anura). *Chemosphere*. 81(10): 1292-1300.

Park K, Kwak IS (2010). Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. *Chemosphere*. 79(9): 934-941.

Park K, Kwak IS (2012). Gene expression of ribosomal protein mRNA in *Chironomus riparius*: effects of endocrine disruptor chemicals and antibiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology, Pharmacology and Endocrinology*. 156(2): 113-120.

Park SY, Nair PM, Choi J (2012). Characterization and expression of superoxide dismutase genes in *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) larvae as a potential biomarker of ecotoxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology, Pharmacology and Endocrinology*. 156(3-4): 187-194.

Pascoe D, Carroll K, Karntanut W, Watts MM (2002). Toxicity of 17alpha-ethinylestradiol and bisphenol A to the freshwater Cnidarian *Hydra vulgaris*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 43(1): 56-63.

Paul KB, Hedge JM, DeVito MJ, Crofton KM (2010a). Short-term exposure to triclosan decreases thyroxine in vivo via upregulation of hepatic catabolism in Young Long-Evans rats. *Toxicological Sciences*. 113(2): 367-379.

Paul KB, Hedge JM, DeVito MJ, Crofton KM (2010b). Developmental triclosan exposure decreases maternal and neonatal thyroxine in rats. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29(12): 2840-2844.

Paul KB, Hedge JM, Bansal R, Zoeller RT, Peter R, DeVito MJ, Crofton KM (2012). Developmental triclosan exposure decreases maternal, fetal, and early neonatal thyroxine: a dynamic and kinetic evaluation of a putative mode-of-action. *Toxicology*. 300(1-2): 31-45.

Paul KB, Thompson JT, Simmons SO, Vanden Heuvel JP, Crofton KM (2013). Evidence for triclosan-induced activation of human and rodent xenobiotic nuclear receptors. *Toxicology in vitro*. 27(7): 2049-2060.

Pearson WR (2005). Phylogenies of glutathione transferase families. *Methods in Enzymology*. 401: 186-204.

Peng Y, Luo Y, Nie XP, Liao W, Yang YF, Ying GG (2013). Toxic effects of triclosan on the detoxification system and breeding of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*. 22(9): 1384-1394.

Pérez J, Monteiro MS, Quintaneiro C, Soares AM, Loureiro S (2013). Characterization of cholinesterases in *Chironomus riparius* and the effects of three herbicides on chlorpyrifos toxicity. *Aquatic Toxicology*. 144-145: 296-302.

Perron MM, Ho KT, Cantwell MG, Burgess RM, Pelletier MC (2012). Effects of triclosan on marine benthic and epibenthic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31(8): 1861-1866.

Petridis P, Jha AN, Langston WJ (2009). Measurements of the genotoxic potential of (xeno-) oestrogens in the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*, using the Comet assay. *Aquatic Toxicology*. 94(1): 8-15.

Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29(9): e45.

Piña B, Barata C (2011). A genomic and ecotoxicological perspective of DNA array studies in aquatic environmental risk assessment. *Aquatic Toxicology*. 105(Supl. 3-4): 40-49.

Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2008). The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. *Chemosphere*. 71(10): 1870-1876.

Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2010). Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone-nuclear receptor genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment*. 408(7): 1598-1603.

Planelló R, Herrero O, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2011). Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. *Aquatic Toxicology*. 105(1-2): 62-70.

Ponzo OJ, Silvia C (2013). Evidence of reproductive disruption associated with neuroendocrine changes induced by UV-B filters, phthalates and nonylphenol during sexual maturation in rats of both gender. *Toxicology*. 311(1-2): 41-51.

Quinn-Hosey KM, Roche JJ, Fogarty AM, Brougham CA (2012). Screening for genotoxicity and oestrogenicity of endocrine disrupting chemicals *in vitro*. *Journal of Environmental Protection*. 3: 902-914.

Rajakpaxe N, Ong D, Kortenkamp A (2001). Defining the impact of weakly estrogenic chemicals on the action of steroidal estrogens. *Toxicological Sciences*. 60(2): 296-304.

Ramussen JB (1985). Effects of density and microdetritus enrichment on the growth of chironomid larvae in a small pond. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 42(8): 1418-1422.

Rankin SM, Grosjean EM (2010). Effects of bisphenol A in the ring-legged earwig, *Euborellia annulipes*. *Ecotoxicology*. 19(4): 635-642.

Ranson H, Rossiter L, Ortelli F, Jensen B, Wang X, Roth CW, Collins FH, Hemingway J (2001). Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *The Biochemical Journal*. 359(Pt. 2): 295-304.

Ranson H, Claudianos C, Ortelli F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova MV, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R (2002). Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science*. 298(5591): 179-181.

Ranson H, Hemingway J (2005). Mosquito glutathione transferases. *Methods in Enzymology*. 401: 226-241.

Rauch P, Grebe M, Elke C, Spindler KD, Spindler-Barth M (1998). Ecdysteroid receptor and ultraspiracle from *Chironomus tentans* (Insecta) are phosphoproteins and are regulated differently by molting hormone. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28(4): 265-275.

Raut SA, Angus RA (2010). Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29(6): 1287-1291.

Reglamento (CE) n.º 1907/2006 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 el Reglamento (CEE) n.º 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) n.º 1488/94 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.

Reglamento (CE) n.º 440/2008 de la Comisión de 30 de mayo de 2008 por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH).

Reglamento (UE) n.º 260/2014 de la Comisión de 24 de enero de 2014 que modifica, con vistas a su adaptación al progreso técnico, el Reglamento (CE) n.º 440/2008, por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH).

Reineke A (2005). Identification and expression of a small heat shock protein in two lines of the endoparasitic wasp *Venturia canescens*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*. 141(1): 60-69.

Rettie AE, Kelly EJ (2008). The CYP4 family. En: Ioannides C (Ed.). *Cytochrome P450: role in the metabolism and toxicity of drugs and other xenobiotics*. Royal Society of Chemistry. Londres.

Rewitz KF, Styrihave B, Andersen O (2003). CYP330A1 and CYP4C39 enzymes in the shore crab *Carcinus maenas*: sequence and expression regulation by ecdysteroids and xenobiotics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 310(2): 252-260.

Rewitz KF, Rybczynski R, Warren JT, Gilbert LI (2006). Identification, characterization and developmental expression of Halloween genes encoding P450 enzymes mediating ecdysone

biosynthesis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36(3): 188-199.

Rhee JS, Raisuddin S, Lee KW, Seo JS, Ki JS, Kim IC, Park HG, Lee JS (2009). Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* to environmental toxicants. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology, Pharmacology and Endocrinology*. 149(1): 104-112.

Richards G (1981). Insect hormones in development. *Biological Reviews*. 56(4): 501-549.

Richter CA, Taylor JA, Ruhlen RL, Welshons WV, Vom Saal FS (2007). Estradiol and bisphenol A stimulate androgen receptor and estrogen receptor gene expression in fetal mouse prostate mesenchyme cells. *Environmental Health Perspectives*. 115(6): 902-908.

Riddiford LM (1978). Ecdysone-induced change in cellular commitment of the epidermis of the tobacco hornworm *Manduca sexta*, at the initiation of metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*. 34(4): 438-446.

Riddiford LM (1993). Hormones and *Drosophila* development. En: Bate M, Martinez-Arias A (Eds.). *The development of *Drosophila melanogaster**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York.

Riddihough G, Pelham HR (1987). An ecdysone response element in the *Drosophila* hsp27 promoter. *EMBO Journal*. 6(12): 3729-3734.

Rieradevall M, García-Berthou E, Prat N (1995). Chironomids in the diet of fish in Lake Banyoles (Catalonia, Spain). En: Cranston PS (Ed.). *Chironomids: from genes to ecosystems*. CSIRO. Melbourne.

Ritossa F (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *drosophila*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 18(12): 571-573.

Riva C, Porte C, Binelli A, Provini A (2010). Evaluation of 4-nonylphenol *in vivo* exposure in *Dreissena polymorpha*: Bioaccumulation, steroid levels and oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology, Pharmacology and Endocrinology*. 152(2): 175-181.

Rivero CL, Barbosa AC, Ferreira MF, Dorea JG, Grisolia CK (2008). Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Ecotoxicology*. 17(8): 732-737.

Robinson A, Huttley GA, Booth HS, Board PG (2004). Modelling and bioinformatics studies of the human Kappa-class glutathione transferase predict a novel third glutathione transferase family with similarity to prokaryotic 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerases. *The Biochemical Journal*. 379(Pt. 3): 541-552.

Rudzok S, Schmücking E, Graebisch C, Herbarth O, Bauer M (2009). The inducibility of human cytochrome P450 1A by environmental-relevant xenobiotics in the human hepatoma derived cell line HepG2. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 28(3): 370-378.

Russell WMS, Burch RL (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen. Londres.

Ryan JA, Hightower LE (1998). Heat shock proteins: molecular biomarkers of effects. En: Puga A, Wallale KB (Eds.). *Molecular biology of the toxic response*. Hamilton Printing Company. Nueva York.

Rzeuski R, Chlubek D, Machoy Z (1998). Interactions between fluoride and biological free radical reactions. *Fluoride*. 31(1): 43-45.

Sadowski MI, Jones DT (2007). Benchmarking template selection and model quality assessment for high-resolution comparative modeling. *Proteins*. 69(3): 476-485.

Sahu SC (2008). *Toxicogenomics. A powerful tool for toxicity assessment*. John Wiley and Sons. Nueva York.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York.

San Segundo L, Martini F, Pablos MV (2013). Gene expression responses for detecting sublethal effects of xenobiotics and whole effluents on a *Xenopus laevis* embryo assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 32(9): 2018-2025.

Schirling M, Jungmann D, Ladewig V, Ludwichowski KU, Nagel R, Köhler HR, Triebkorn R (2006). Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). *Ecotoxicology*. 15(2): 143-156.

Segner H, Carroll K, Fenske M, Janssen CR, Maack G, Pascoe D, Schäfers C, Vanderbergh GF, Watts M, Wenzel A (2003). Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 54(3): 302-314.

Sekimoto T, Iwami M, Sakurai S (2006). Coordinate responses of transcription factors to ecdysone during programmed cell death in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*. 15(3): 281-292.

Shang DY, Macdonald RW, Ikonomou MG (1999). Persistence of nonylphenol ethoxilate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the strait of Georgia, British Columbia, Canada. *Environmental Science and Technology*. 33(9): 1366-1372.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *The Biochemical Journal*. 360(Pt. 1): 1-16.

Shen H, Zhou, Bai A, Ren X, Zhang Y (2013). Ecdysone receptor gene from the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*: identification of different splice variants and sexually dimorphic expression, fluctuation of expression in the molt cycle and effect of eyestalk ablation. *General and Comparative Endocrinology*. 193: 86-94.

Shirai H, Kamimura M, Fujiwara H (2007). Characterization of core promoter elements for ecdysone receptor isoforms of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*. 16(2): 253-264.

Shugart L, Bickham J, Jackim G, McMahon G, Ridley W, Stein J, Steinert SA (1992). DNA alterations. En: Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle Jr. PM, Bergman HL (Eds.). *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis. Boca Ratón.

Silver JT, Noble EG (2012). Regulation of survival gene hsp70. *Cell Stress and Chaperones*. 17(1): 1-9.

Simpson AE (1997). The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *General Pharmacology*. 28(3): 351-359.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175(1): 184-191.

Snell TW, Brogdon SE, Morgan MB (2003). Gene expression profiling in ecotoxicology. *Ecotoxicology*. 12(6): 475-483.

Snyder MJ (2000). Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions. *Aquatic Toxicology*. 48(4): 529-547.

Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN (2008). Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environmet International*. 34(7): 1033-1049.

Sørensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*. 6(11): 1025-1037.

Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C (1991). p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environmental Health Perspectives*. 92: 167-173.

Southgate R, Ayme A, Voellmy R (1983). Nucleotide sequence analysis of the *Drosophila* small heat shock gene cluster at locus 67B. *Journal of Molecular Biology*. 165(1): 35-57.

Steinert SA (1999). DNA damage as bivalve biomarker and as an environmental assessment tool. *Biomarkers*. 4(6): 492-496.

Sun Y, MacRae TH (2005). Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 62(21): 2460-2476.

Taenzler V, Bruns E, Dorgerloh M, Pfeifle V, Weltje L (2007). Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine disrupting properties of pesticides. *Ecotoxicology*. 16(1): 221-230.

Takayanagi S, Tokunaga T, Liu X, Okada H, Matsushima A, Shimohigashi Y (2006). Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ) with high constitutive activity. *Toxicology Letters*. 167(2): 95-105.

Talbot WS, Swyryd EA, Hogness DS (1993). *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell*. 73(7): 1323-1337.

Tan A, Palli SR (2008). Ecdysone receptor isoforms play distinct roles in controlling molting and metamorphosis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 291(1-2): 42-49.

Tassou KT, Schulz R (2009). Effects of the insect growth regulator pyriproxyfen in a two-generation test with *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72(4): 1058-1062.

Tatarazako N, Ishibashi H, Teshima K, Kishi K, Arizono K (2004). Effects of triclosan on various aquatic organisms. *Environmental Sciences*. 11(2): 133-140.

Tayama S, Nakagawa Y, Tayama K (2008). Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells. *Mutation Research*. 649(1-2): 114-125.

Terasaka S, Inoue A, Tanji M, Kiyama R (2006). Expression profiling of estrogen-responsive genes in breast cancer cells treated with alkylphenols, chlorinated phenols, parabens, or bis- and benzoylphenols for evaluation of estrogenic activity. *Toxicology Letters*. 163(2): 130-141.

Thiele B, Gunther K, Schwuger MJ (1997). Alkylphenol ethoxylates: trace analysis and environmental behavior. *Chemical Reviews*. 97(8): 3247-3272.

Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*. 84(3): 389-398.

Tiwari D, Kamble J, Chilgunde S, Patil P, Maru G, Kawle D, Bhartiya U, Joseph L, Vanage G (2012). Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: an endocrine disruptor. *Mutation Research*. 743(1-2): 83-90.

Tohidi-Esfahani D, Graham LD, Hannan GN, Simpson AM, Hill RJ (2011). An ecdysone receptor from the pentatomomorph, *Nezara viridula*, shows similar affinities for moulting hormones makisterone A and 20-hydroxyecdysone. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41(2): 77-89.

Tremblay L, Van der Kraak G (1998). Use of a series of homologous *in vitro* and *in vivo* tests to evaluate the endocrine modulating actions of β -sitosterol in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*. 43(2-3): 149-162.

Tsvetkova NM, Horváth I, Török Z, Wolkers WF, Balogi Z, Shigapova N, Crowe LM, Tablin F, Vierling E, Crowe JH, Vigh L (2002). Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(21): 13504-13509.

Tu CP, Akgül B (2005). *Drosophila* glutathione S-transferases. *Methods in Enzymology*. 401: 204-226.

Uguz C, Iscan M, Ergüven A, Işgor B, Togan I (2003). The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Research*. 92(3): 262-270.

Umesono K, Evans RM (1989). Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*. 57(7): 1139-1146.

USEPA (1996). Ecological effects test guidelines, OPPTS 850.1790. Chironomid sediment toxicity test. EPA 712-C-96-313. United States Environmental Protection Agency. Washington DC.

USEPA (2000). Methods of measuring the toxicity and bioaccumulation of sediments associated contaminants with freshwater invertebrates, second edition. EPA 600/R-99/064. United States Environmental Protection Agency. Washington DC.

USEPA (2008). Reregistration eligibility decision for triclosan. EPA 739-RO-8009. United States Environmental Protection Agency. Washington DC.

USEPA (2010). Nonylphenol (NP) and nonylphenol ethoxylates (NPEs) action plan. RIN 2070-ZA09. United States Environmental Protection Agency. Washington DC.

Vaccaro E, Meucci V, Intorre L, Soldani G, Di Bello D, Longo V, Gervasi PG, Pretti C (2005). Effects of 17 β -estradiol, 4-nonylphenol and PCB 126 on the estrogenic activity and phase 1 and 2 biotransformation enzymes in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Toxicology*. 75(4): 293-305.

Valverde M, Rojas E (2009). Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research*. 681(1): 93-109.

Van Gestel CA, Van Brummelen TC (1996). Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*. 5(4): 217-225.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 3(7): 1-12.

Veldhoen N, Skirrow R, Osachoff H, Wigmore H, Clapson DJ, Gunderson MP, van Aggelen G, Helbing CC (2006). The bactericidal agent Triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquatic Toxicology*. 80(3): 217-227.

Verhaegen Y, Parmentier K, Swevers L, Renders E, Rougé P, De Coen W, Cooreman K, Smagghe G (2011). The heterodimeric ecdysteroid receptor complex in the brown shrimp *Crangon crangon*: ECR and RXR isoform characteristics and sensitivity towards the marine pollutant tributyltin. *General and Comparative Endocrinology*. 172(1): 158-169.

Verras M, Mavroidis M, Kokolakis G, Gourzi P, Zacharopoulou A, Mintzas AC (1999). Cloning and characterization of CcEcR. An ecdysone receptor homolog from the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. European Journal of Biochemistry / FEBS. 265(2): 798-808.

Villela IV, de Oliveira IM, da Silva J, Henriques JA (2006). DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. Mutation Research. 605(1-2): 78-86.

Vogt C, Langer-Jaesrich M, Elsässer O, Schmitt C, Van Dongen S, Köhler HR, Oehlmann J, Nowak C (2013). Effects of inbreeding on mouthpart deformities of *Chironomus riparius* under sublethal pesticide exposure. Environmental Toxicology and Chemistry. 32(2): 423-425.

Wang X, Liu Z, Wang W, Yan Z, Zhang C, Wang W, Chen L (2014). Assessment of toxic effects of triclosan on the terrestrial snail (*Achatina fulica*). Chemosphere. 108: 225-230.

Waters ER, Aebermann BD, Sanders-Reed Z (2008). Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes identifies new subfamilies and reveals diverse evolutionary patterns. Cell Stress and Chaperones. 13(2): 127-142.

Watts MM, Pascoe D, Carroll K (2001). Chronic exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). Aquatic Toxicology. 55(1-2): 113-124.

Watts MM, Pascoe D, Carroll K (2003). Exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A - effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 54(2): 207-215.

Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. Endocrinology. 147 (Suppl. 6): S56-S69.

Wetherill YB, Fisher NL, Staubach A, Danielsen M, De Vere White RW, Knudsen KE (2005). Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. Cancer Research. 65(1): 54-65.

Wiseman SB, Anderson JC, Liber K, Giesy JP (2013). Endocrine disruption and oxidative stress in larvae of *Chironomus dilutus* following short-term exposure to fresh or aged oil sands process-affected water. Aquatic Toxicology. 142-143: 414-421.

Wolff MS, Teitelbaum SL, Windham G, Pinney SM, Britton JA, Chelimo C, Godbold J, Biro F, Kushi LH, Pfeiffer CM, Calafat AM (2007). Pilot study of urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols in girls. *Environmental Health Perspectives*. 115(1): 116-121.

Wu F, Xu R, Kim K, Martin J, Safe S (2008). *In vivo* profiling of estrogen receptor/specificity protein-dependent transactivation. *Endocrinology*. 149(11): 5696-5705.

Wu HJ, Liu C, Duan WX, Xu SC, He MD, Chen CH, Wang Y, Zhou Z, Yu ZP, Zhang L, Chen Y (2013). Melatonin ameliorates bisphenol A-induced DNA damage in the germ cells of adult male rats. *Mutation Research*. 752(1-2): 57-67.

Xi Y, Li D, San W (2013). Exposure to the endocrine disruptor nonylphenol alters structure and function of thyroid gland in rats. *Regulatory Peptides*. 185: 52-56.

Xu LC, Sun H, Chen JF, Bian Q, Qian J, Song L, Wang XR (2005). Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol *in vitro*. *Toxicology*. 216(2-3): 197-203.

Xu ZB, Zou XP, Zhang N, Feng QL, Zheng SC (2014). Detoxification of insecticides, allechemicals and heavy metals by glutathione S-transferase SIGSTE1 in the gut of *Spodoptera litura*. *Insect science*. doi: 10.1111/1744-7917.12142.

Yadete F, Arukwe A, Goksøyr A, Male R (1999). Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Atlantic salmon *in vivo* by the environmental estrogen, 4-nonylphenol. *Science of the Total Environment*. 233(1-3): 201-210.

Yang N, Shigeta H, Shi H, Teng CT (1996). Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediated response of human lactoferrin gene promoter. *Journal of Biological Chemistry*. 271(10): 5795-5804.

Yao TP, Segreaves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM (1992). *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*. 71(1): 63-72.

Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and ultraspiracle genes. *Nature*. 366(6454): 476-479.

Yoshimi T, Minowa K, Karouna-Renier NK, Watanabe C, Sugaya Y, Miura T (2002). Activation of stress-induced gene by insecticides in the midge *Chironomus yoshimatsui*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 16(1): 10-17.

Yoshimi T, Odagiri K, Hiroshige Y, Yokobori S, Takahashi Y, Sugaya Y, Miura T (2009). Induction profile of HSP70-cognate genes by environmental pollutants in Chironomidae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 28(2): 294-301.

Yu Q, Lu C, Li B, Fang S, Zuo W, Dai F, Zhang Z, Xiang Z (2008). Identification, genomic organization and expression pattern of glutathione S-transferase in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38(12): 1158-1164.

Yuan HX, Xu X, Sima YH, Xu SQ (2013). Reproductive toxicity effects of 4-nonylphenol with known endocrine disrupting effects and induction of vitellogenin gene expression in silkworm, *Bombyx mori*. *Chemosphere*. 93(2): 263-268.

Ziv-Gal A, Craig ZR, Wang W, Flaws JA (2013). Bisphenol A inhibits cultured mouse ovarian follicle growth partially via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *Reproductive Toxicology*. 42: 58-67.

Zorrilla LM, Gibson EK, Jeffay SC, Crofton KM, Setzer WR, Cooper RL, Stoker TE (2009). The effects of triclosan on puberty and thyroid hormones in male Wistar rats. *Toxicological Sciences*. 107(1): 56-64.

Zou S, Meadows S, Sharp L, Jan LY, Jan YN (2000). Genome-wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(25): 13726-13731.

