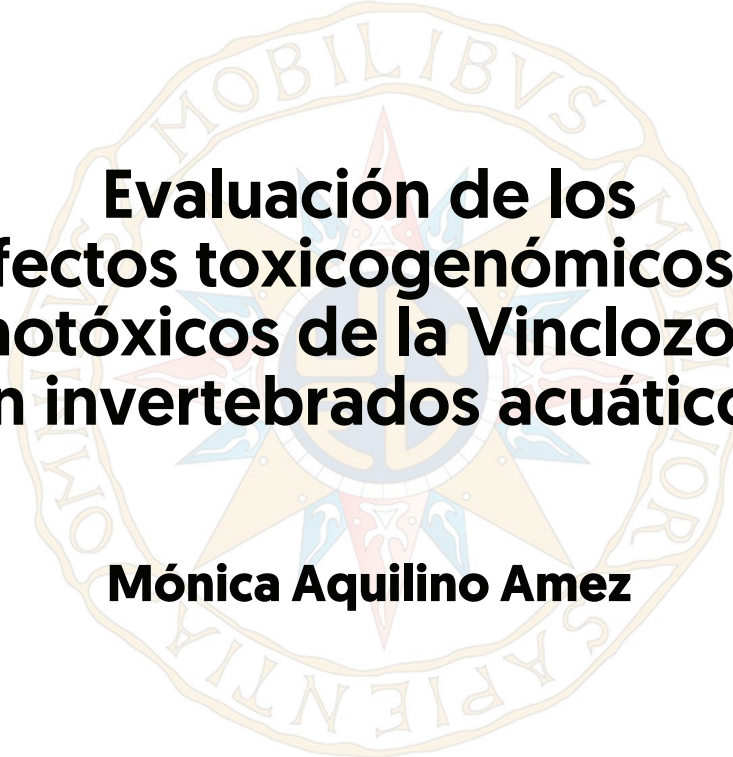


TESIS DOCTORAL

2019



Evaluación de los efectos toxicogenómicos y genotóxicos de la Vinclozolina en invertebrados acuáticos

Mónica Aquilino Amez

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

José Luis Martínez Guitarte

Paloma Sánchez Argüello



Music to Save Us

ÍNDICE

[Clica en cualquier número de página para volver aquí]

1. Resumen / abstract	21
2. Introducción	27
2.1. Contaminación ambiental	27
2.2. Disruptores endocrinos. El caso de la Vinclozolina	28
2.3. Ensayos ecotoxicológicos con invertebrados acuáticos	31
2.3.1. <i>Chironomus riparius</i>	32
2.3.2. <i>Physa acuta</i>	33
2.4. Biomarcadores moleculares	34
2.4.1. Biomarcadores de expresión génica del sistema endocrino	34
2.4.2. Biomarcadores de expresión génica de proteínas de choque/estrés celular, detoxificación y daño en el ADN	38
2.4.3. Biomarcadores génicos polisomales	41
2.5. Valoración del daño en el ADN. Ensayo cometa	42
3. Objetivos	47
4. Material y métodos	51
4.1. Especies de ensayo	51
4.1.1. <i>Chironomus riparius</i>	51
4.1.2. <i>Physa acuta</i>	51
4.2. Vinclozolina	52
4.3. Reactivos	53
4.4. Oligonucleótidos de <i>Chironomus riparius</i>	53
4.5. Oligonucleótidos de <i>Physa acuta</i>	54
4.6. Tratamientos experimentales	55
4.6.1. Ensayos de exposición aguda con larvas de <i>Chironomus riparius</i>	56
4.6.1.1. Análisis de la supervivencia	56
4.6.1.2. Análisis de los niveles de expresión génica	56
4.6.1.3. Análisis de la genotoxicidad [ensayo cometa]	56
4.6.2. Ensayos de reproducción con <i>Chironomus riparius</i>	56
4.6.3. Ensayos de embriotoxicidad con <i>Chironomus riparius</i>	58

ÍNDICE

4.6.3.1. Análisis de la tasa de eclosión	58
4.6.3.2. Análisis de los niveles de expresión génica	58
4.6.4. Ensayos de exposición aguda con <i>Physa acuta</i>	60
4.6.4.1. Análisis de la supervivencia	60
4.6.4.2. Análisis de los niveles de expresión génica	60
4.6.4.3. Análisis de la genotoxicidad [ensayo cometa]	60
4.7. Métodos moleculares y de genotoxicidad	60
4.7.1. Extracción de ARN	60
4.7.2. Extracción de ARN polisomal	61
4.7.3. Retrotranscripción	62
4.7.4. Análisis de los niveles de expresión génica	62
4.7.4.1. Obtención e identificación de secuencias y diseño de oligonucleótidos	63
4.7.4.2. Cálculo de las eficiencias de amplificación de los oligonucleótidos	63
4.7.4.3. Amplificación de los genes de estudio	64
4.7.5. Ensayo cometa	64
4.7.5.1. Procedimiento experimental	64
4.7.5.2. Cuantificación	66
4.7.6. Análisis de datos	66
5. Resultados	69
5.1. Exposiciones agudas de Vinclozolina en larvas de <i>Chironomus riparius</i>	69
5.1.1. Efectos en la supervivencia	69
5.1.2. Efectos en la expresión génica	70
5.1.2.1. Efectos sobre la expresión de genes relacionados con el sistema endocrino	70
5.1.2.2. Efectos de la Vinclozolina en la respuesta a estrés celular	73
5.1.2.3. Efectos de la Vinclozolina sobre el sistema de detoxificación celular	73
5.1.3. Efectos genotóxicos de la Vinclozolina	75
5.1.3.1. Ensayo cometa	75
5.1.3.2. Efectos de la Vinclozolina en la expresión de genes relacionados con el daño al ADN	76

5.2. Exposición crónica en sistemas agua-sedimento de larvas de <i>Chironomus riparius</i> . Efectos en el desarrollo y la reproducción	78
5.3. Efectos de la Vinclozolina sobre embriones de <i>Chironomus riparius</i>	78
5.3.1. Efectos embriotóxicos	79
5.3.2. Efectos en la expresión génica	80
5.3.2.1. Efecto de la Vinclozolina sobre genes relacionados con el sistema endocrino	80
5.3.2.2. Efecto de la Vinclozolina sobre genes relacionados con la respuesta a estrés celular	83
5.4. Exposiciones agudas de Vinclozolina en adultos de <i>Physa acuta</i>	85
5.4.1. Efectos en la supervivencia	85
5.4.2. Efectos en la expresión génica	85
5.4.2.1. Efectos de la Vinclozolina sobre la expresión de genes relacionados con el sistema endocrino	86
5.4.2.2. Efectos de la Vinclozolina en la respuesta a estrés celular	86
5.4.2.3. Efectos sobre el sistema de detoxificación celular	88
5.4.3. Efectos genotóxicos de la Vinclozolina	88
5.4.3.1. Ensayo cometa	88
5.4.3.2. Efectos de la Vinclozolina en genes relacionados con el daño al ADN	90
5.5. Efecto de la Vinclozolina en biomarcadores génicos polisomales	92
5.5.1. Efecto de la Vinclozolina en biomarcadores génicos polisomales de <i>Chironomus riparius</i>	93
5.5.1.1. Efectos sobre el sistema endocrino	93
5.5.1.2. Efectos en la respuesta a estrés celular	95
5.5.1.3. Efectos en la respuesta de detoxificación celular	96
6. Discusión	99
6.1. Ensayos ecotoxicológicos	99
6.2. Efectos en la expresión génica	101

ÍNDICE

7. Conclusiones / conclusions	113
8. Bibliografía	119
9. Anexos	131
9.1. Anexo I. Secuencias empleadas para el posterior diseño de las parejas de oligonucleótidos que han permitido amplificar los genes de <i>Physa acuta</i>	133
9.2. Anexo II. Artículos científicos publicados y directamente relacionados con el presente trabajo	139
9.2.1. Vinclozolin alters the expression of hormonal and stress genes in the midge <i>Chironomus riparius</i>	143
9.2.2. Genotoxic effects of vinclozolin on the aquatic insect <i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	179
9.2.3. Effects on tadpole snail gene expression after exposure to vinclozolin	211
9.3. Anexo III. Otros artículos científicos publicados durante el desarrollo de la tesis	253
9.3.1. Combining the assessment of apical endpoints and gene expression in the freshwater snail <i>Physa acuta</i> after exposure to reclaimed water	255
9.3.2. The BPA-substitute bisphenol S alters the transcription of genes related to endocrine, stress response and biotransformation pathways in the aquatic midge <i>Chironomus riparius</i> (Diptera, Chironomidae)	257
9.3.3. Ultraviolet filters and heat shock proteins: effects in <i>Chironomus riparius</i> by benzophenone-3 and 4-methylbenzylidene camphor	259
9.3.4. UV filters induce transcriptional changes of different hormonal receptors in <i>Chironomus riparius</i> embryos and larvae	261

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales características físico-químicas de la Vinclozolina	52
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en <i>Chironomus riparius</i> para la amplificación por PCR en Tiempo Real de los genes de estudio	54
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en <i>Physa acuta</i> para la amplificación por PCR en Tiempo Real de los genes de estudio	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de sustancias consideradas como disruptores endocrinos	28
Figura 2. Efectos de un disruptor endocrino sobre receptores hormonales	30
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Chironomus riparius</i>	32
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Physa acuta</i>	33
Figura 5. Esquema general de la producción de hormonas y su papel en el desarrollo de insectos	35
Figura 6. Ruta hormonal de la ecdisona	36
Figura 7. Principales etapas del sistema de detoxificación celular	39
Figura 8. Perfil polisomal obtenido en un gradiente de sacarosa de 10-40% leído a 254 nm de absorción UV	41
Figura 9. Imagen de una célula procesada con el programa <i>Comet Score</i> TM , donde se diferencian la cabeza y la cola del cometa	43
Figura 10. Imágenes representativas de embriones de <i>Chironomus riparius</i>	59
Figura 11. Curvas de supervivencia de larvas de cuarto estadio de <i>Chironomus riparius</i>	69
Figura 12. Efectos de la Vinclozolina sobre los genes <i>EcR</i> , <i>E74</i> y <i>Kr-h1</i> de <i>Chironomus riparius</i> , relacionados con el sistema endocrino	71
Figura 13. Efectos de la Vinclozolina sobre los genes <i>DIS</i> , <i>Cyp18a1</i> , <i>FOXO</i> y <i>MAPR</i> de <i>Chironomus riparius</i> , relacionados con el sistema endocrino	72
Figura 14. Efectos de la Vinclozolina sobre genes de <i>Chironomus riparius</i> relacionados con la respuesta a estrés celular	74
Figura 15. Efectos de la Vinclozolina sobre el sistema de detoxificación celular de <i>Chironomus riparius</i>	75



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 16. Análisis del efecto genotóxico en el ADN de larvas de <i>Chironomus riparius</i>	76
Figura 17. Efectos de la Vinclozolina sobre genes de <i>Chironomus riparius</i> relacionados con el daño al ADN	77
Figura 18. Efectos sobre el desarrollo y la reproducción de <i>Chironomus riparius</i>	79
Figura 19. Efectos sobre el porcentaje de eclosión de embriones de <i>Chironomus riparius</i>	80
Figura 20. Análisis de expresión del ARNm en genes relacionados con el sistema endocrino [<i>EcR</i> , <i>E74</i>] de embriones de <i>Chironomus riparius</i>	81
Figura 21. Análisis de expresión del ARNm en genes relacionados con el sistema endocrino [<i>MET</i> , <i>MAPR</i> e <i>INR</i>] de embriones de <i>Chironomus riparius</i>	82
Figura 22. Análisis de expresión del ARNm del gen <i>Gp93</i> , relacionado con la respuesta a estrés celular de embriones de <i>Chironomus riparius</i>	83
Figura 23. Análisis de expresión de los genes <i>Hsp40</i> , <i>Hsp60</i> y <i>Hsp70</i> , de la respuesta a estrés celular de embriones de <i>Chironomus riparius</i>	84
Figura 24. Curva de supervivencia de <i>Physa acuta</i>	85
Figura 25. Efecto de la Vinclozolina sobre genes relacionados con el sistema endocrino de <i>Physa acuta</i>	86
Figura 26. Análisis de expresión del ARNm de los genes <i>Hsp16.6</i> , <i>Hsp17</i> , <i>Hsp20.4</i> y <i>Cu/Zn SOD</i> en adultos de <i>Physa acuta</i>	87
Figura 27. Efectos de la Vinclozolina sobre genes relacionados con mecanismos de detoxificación de <i>Physa acuta</i>	89
Figura 28. Análisis del efecto genotóxico en el ADN de adultos de <i>Physa acuta</i>	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 29. Efecto de la Vinclozolina sobre los genes <i>ATM</i> , <i>ATR</i> y <i>RAD-1</i> , relacionados con el daño al ADN en <i>Physa acuta</i>	91
Figura 30. Efecto de la Vinclozolina sobre los genes <i>CASP3</i> , <i>XPA-1</i> , <i>XRCC-2</i> y <i>XRCC-4</i> , relacionados con el daño al ADN en <i>Physa acuta</i>	92
Figura 31. Efectos de la Vinclozolina sobre la expresión polisomal de <i>EcR</i> , <i>E74</i> y <i>Kr-h1</i> de <i>Chironomus riparius</i> , relacionados con el sistema endocrino	93
Figura 32. Efectos de la Vinclozolina sobre la expresión polisomal de <i>DIS</i> , <i>Cyp18a1</i> , <i>FOXO</i> , y <i>MAPR</i> de <i>Chironomus riparius</i> , relacionados con el sistema endocrino	94
Figura 33. Efectos de la Vinclozolina sobre la expresión polisomal de genes de <i>Chironomus riparius</i> relacionados con la respuesta a estrés celular	95
Figura 34. Efectos de la Vinclozolina sobre la expresión polisomal de genes de <i>Chironomus riparius</i> relacionados con el sistema de detoxificación celular	96

ABREVIATURAS

20E	20-Hydroxyecdysone
°C	Grado centígrado
<i>C. riparius</i>	<i>Chironomus riparius</i>
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ANOVA	Del inglés <i>Analysis of variance</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATM	Del inglés <i>ataxia-telangiectasia</i>
ATR	Del inglés <i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
<i>Casp3</i>	Del inglés <i>Cysteine-aspartic acid protease</i>
cc	<i>Corpus cardiacum</i>
Ct	Ciclo umbral
CYP	Proteína citocromo P450 [del inglés <i>cytochrome P450</i>]
DECAY	Del inglés <i>death executioner caspase related to Apopain/Yama</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DO	Densidad óptica
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DSBs	Del inglés <i>double-strand breaks</i>
DTT	Ditiotreitol
EC	<i>European Commission</i>

ABREVIATURAS

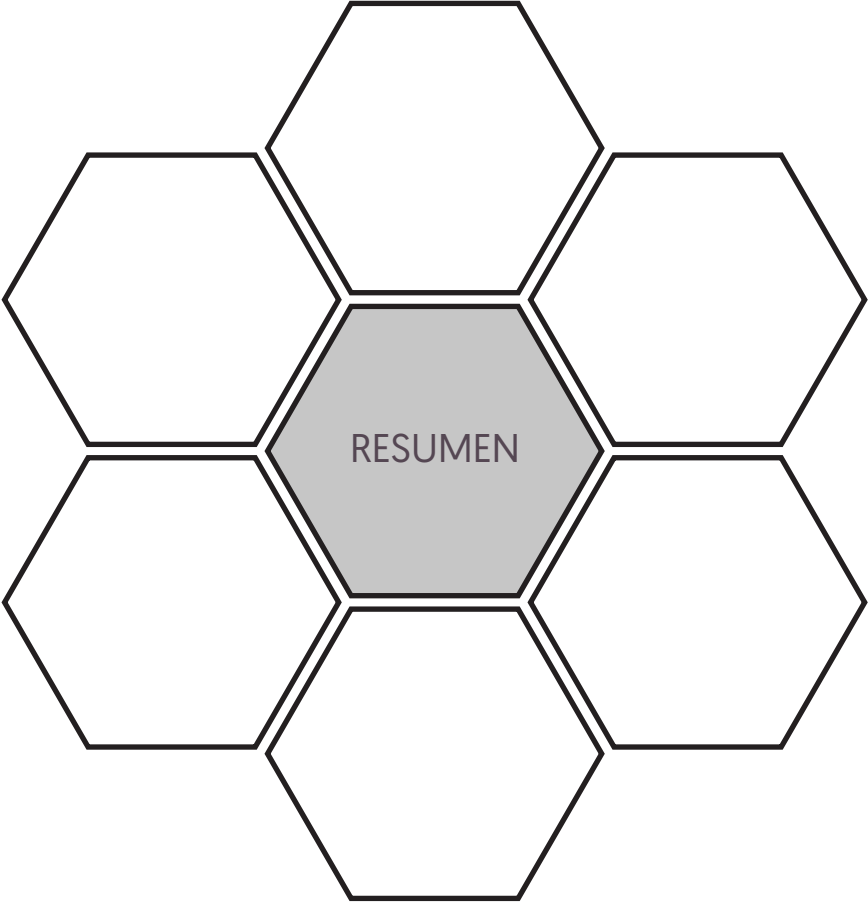
ECHA	<i>European Chemicals Agency</i>
EcR	Receptor de ecdisona [del inglés <i>Ecdysone Receptor</i>]
EDC	Compuesto disruptor endocrino [del inglés <i>endocrine disrupter chemical</i>]
EDTA	Ácido etilén diaminotetraacético
EE.UU.	Estados Unidos
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [del inglés <i>European Food Safety Authority</i>]
EtOH	Etanol
EPs	Emerging pollutants
ER	Receptor de estrógenos [del inglés <i>estrogen receptor</i>]
ERR	Receptor relacionado con estrógenos [del inglés <i>Estrogen-Related Receptor</i>]
FITC	Isocianato de fluoresceína
FOXO	Del inglés <i>Fordheabox O</i>
g	Del inglés <i>G-force</i>
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GP93	Del inglés <i>glycoprotein 93</i>
GSH	Glutación
GST	Glutación S-transferasa
HAP	Hidrocarburo aromático policíclico
HSC	Proteína de choque térmico constitutiva [del inglés <i>Heat shock cognate</i>]
HJ	Hormona juvenil
HM	Hormona de la muda
sHSP	Proteína de choque térmico de pequeño tamaño [del inglés <i>small heat shock protein</i>]
HPPT	Hormona protoracicotrópica
HSP	Proteína de choque térmico [del inglés <i>Heat shock protein</i>]

ABREVIATURAS

INIA	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
INR	Del inglés <i>Insulin-like receptor</i>
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
MAPR	Del inglés <i>Membrane associated progesterone receptor</i>
Met	Del inglés <i>Methoprene tolerant</i>
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NER	Del inglés <i>Nucleotide excision repair</i>
NLK	Del inglés <i>Nemo like Kinase</i>
NP	Nonilfenol
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>P. acuta</i>	<i>Physa acuta</i> o <i>Physella acuta</i>
pb	Pares de bases
PDB	Base de Datos de Proteínas (del inglés <i>protein database</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCB	Bifenilo policlorado
poliA	Secuencia de poliadeninas
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i>
rpl10	Proteína ribosómica L13
rpl13	Proteína ribosómica L10

ABREVIATURAS

RT	Retrotranscripción
RT-PCR	PCR en tiempo real
SCGE	<i>Single Cell Gel Electrophoresis</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
SPSS	<i>Statistical Product and Service Solutions</i>
SSB	Del inglés <i>single-strand break</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TSA	<i>Transcriptome Shotgun Assembly Sequence Database</i>
UE	Unión Europea
UNED	Universidad Nacional de Educación a Distancia
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
USP	Ultraespiráculo (del inglés <i>Ultraspiracle</i>)
Vz	Vinclozolina
XRCC-1	Del inglés <i>X-Ray Repair Cross Complementig 1</i>
XRCC-2	Del inglés <i>X-Ray Repair Cross Complementig 2</i>
XRCC-4	Del inglés <i>X-Ray Repair Cross Complementig 4</i>
XPA-1	Del inglés <i>Xeroderma pigmentosum A1</i>



1. Resumen

El objetivo general del presente trabajo, ha sido evaluar el efecto toxicogenómico y genotóxico del plaguicida Vinclozolina [Vz] en invertebrados acuáticos. Se ha demostrado que la Vz actúa como disruptor endocrino con actividad anti-androgénica en mamíferos. Se han descrito así mismo sus efectos en la reproducción de organismos acuáticos (peces e invertebrados), aunque no se conoce el mecanismo de acción en estos últimos.

En esta tesis doctoral se ha trabajado con dos especies de invertebrados, un insecto díptero [*Chironomus riparius*] y dos de sus fases del ciclo de vida [embriones y larvas] y la fase adulta de un molusco de agua dulce [*Physa acuta*], con el objetivo de avanzar en el conocimiento sobre el mecanismo de acción de la Vz en invertebrados.

El estudio de los efectos toxicogenómicos de la Vz se llevó a cabo tras tratamientos agudos mediante el análisis de cambios en la expresión de genes relacionadas con distintos procesos fisiológicos: sistema endocrino [*EcR*, *E74*, *Kr-h1*, *DIS*, *Cyp18a1*, *FOXO*, *MAPR*, *INR*, *MET*, *ER*], respuesta celular de estrés [*Hsp16.6*, *Hsp17*, *Hsp20.4*, *Hsp24*, *Hsp40*, *Hsp60*, *Hsp70*, *Gp93*, *Cu/Zn SOD*], metabolismo de xenobióticos [*Cyp4G*, *Cyp2U1*, *Cyp3A7*, *Cyp4F22*, *GSTt2*, *GSTo1*, *GstD3*, y *MRP1-ABC*] y mecanismos de reparación del ADN [*ATM*, *ATR*, *CASP3*, *DECAY*, *NLK*, *RAD-1*, *XRCC-1*, *XRCC-2* y *XRCC-4*]. Este último [estudio toxicogenómico sobre mecanismos de reparación del ADN] se completó con el ensayo cometa para conocer el daño en el ADN por rotura de doble hebra. Finalmente, los efectos de la Vz en la reproducción se valoraron en *C. riparius* mediante la exposición crónica de larvas hasta la emergencia de la fase adulta [mosquitos] en sistemas agua-sedimento.

La Vz no afecta a la supervivencia de larvas de *C. riparius* ni de adultos de *P. acuta*. Sin embargo, sí afecta al desarrollo de embriones de *C. riparius*, y de manera más severa cuando la generación parental es previamente expuesta. Por otro lado, no se observaron efectos en el ensayo de reproducción de *C. riparius* salvo una tendencia no significativa a aumentar la fecundidad a medida que aumenta la concentración de Vz.

Los resultados obtenidos para la expresión génica tanto de embriones como de larvas de *C. riparius* demostraron un efecto en el sistema endocrino a nivel de regulación hormonal alterando la expresión de *EcR*, *E74*, *MET*, *MAPR* y *FOXO* y, al mismo tiempo, modificando el metabolismo de la ecdisona como refleja *DIS* y *Cyp18a1*. Sin embargo, el único receptor hormonal analizado en *P. acuta* [*ER*] no experimentó cambios en su expresión tras la exposición a Vz.

Por otro lado, los resultados observados para la respuesta a estrés celular tanto en embriones como en larvas de *C. riparius* mostraron una activación de la *Hsp40*, *Hsp24* y *Hsp70*. Además de la activación de mecanismos de detoxificación [*Cyp4G*]. Nuevamente, *P. acuta* mostró un comportamiento diferente ya que se observó la inhibición de *Hsp20.4* y no hubo activación de ninguno de los genes estudiados relacionados con los procesos de detoxificación.

El ensayo cometa demostró en ambas especies la capacidad de la Vz para inducir daño en el ADN, aunque solo se observó una relación dosis-respuesta significativa para todos los parámetros analizados [porcentaje de ADN en cola, longitud de la cola, momento cola, momento oliva] en el caso de *C. riparius*. Por último, la sobreexpresión de genes involucrados en mecanismos de reparación del ADN [*ATM* y *XRCC-1*] observada en *C. riparius* demuestra que este organismo es capaz de activar dichos mecanismos, mientras que en el caso de *P. acuta* se observó una inhibición para el mismo gen o un análogo [*ATM* y *XRCC-2*].

En esta tesis doctoral se han comprobado los efectos genotóxicos de la Vz en insectos y moluscos acuáticos, relacionándose por primera vez con la actividad transcripcional de genes involucrados en mecanismos de reparación del ADN. Los resultados permiten concluir que la Vz puede alterar genes clave en la ruta de señalización mediada por ecdisona y otras rutas hormonales, sugiriendo así una interacción directa de este contaminante con el sistema endocrino de insectos. Del mismo modo, se confirma la activación de dianas de estrés celular y de rutas de detoxificación en este grupo de invertebrados. La falta de respuesta observada en genes de ruta endocrina, estrés celular y detoxificación observada en *P. acuta*, ponen de manifiesto la necesidad de continuar explorando otras dianas moleculares para moluscos en el estudio del mecanismo de acción de disruptores endocrinos. Finalmente, estos resultados ponen de relieve la necesidad de utilizar distintas dianas moleculares en varias especies representativas de distintos taxones de invertebrados en el estudio del mecanismo de acción de disruptores endocrinos.

1. Abstract

The general objective of this work was to evaluate the toxicogenomic and genotoxic effects of the pesticide Vinclozolin [Vz] in aquatic invertebrates. It has been shown that Vz acts as an endocrine disruptor with anti-androgenic activity in mammals. Its effect on the reproduction of aquatic organisms [fish and invertebrates] has also been described, although via an unknown mechanism.

In this doctoral thesis, I worked with two species of invertebrates [embryo and larva of the dipteran insect *Chironomus riparius* and the adult phase of the freshwater mollusk *Physa acuta*], with the objective of improving our knowledge of the mechanism of action of Vz in invertebrates.

The toxicogenomic effects of Vz were determined following acute exposure by analysis of the expression of genes related to different physiological processes: endocrine system [*EcR*, *E74*, *Kr-h1*, *DIS*, *Cyp18a1*, *FOXO*, *MAPR*, *INR*, *MET*, *ER*]; cellular stress response [*Hsp16.6*, *Hsp17*, *Hsp20.4*, *Hsp24*, *Hsp40*, *Hsp60*, *Hsp70*, *Gp93*, *Cu/Zn SOD*]; xenobiotic metabolism [*Cyp4G*, *Cyp2U1*, *Cyp3A7*, *Cyp4F22*, *GSTt2*, *GSTo1*, *GstD3*, *MRP1-ABC*]; and DNA repair mechanisms [*ATM*, *ATR*, *CASP3*, *DECAY*, *NLK*, *RAD-1*, *XRCC-1*, *XRCC-2* and *XRCC-4*]. To study the impact of Vz on DNA repair mechanisms, the comet assay was used to determine the DNA damage induced by double-strand breakage. Finally, the effects of Vz on reproduction were evaluated in *C. riparius* through the chronic exposure of larvae until emergence of the adult phase in water-sediment systems.

Although Vz did not affect the survival of larvae of *C. riparius* or adults of *P. acuta*, it does affect the development of *C. riparius* embryos, and more severely when the parental generation was previously exposed. However, no effect was observed in the reproduction test of *C. riparius* except for a non-significant tendency to increase fecundity as the concentration of Vz increased.

Gene expression results in both embryos and larvae of *C. riparius* demonstrated endocrine system effects at the level of hormonal regulation, by altering the expression of *EcR*, *E74*, *MET*, *MAPR*, *FOXO* and at the same time modifying the metabolism of ecdysone as reflected by *DIS* and *Cyp18a1*. However, the only hormone receptor analyzed in *P. acuta* [*ER*] did not experience changes in its expression after exposure to Vz.

On the other hand, the results observed for the response to cellular stress in both embryos and larvae of *C. riparius* showed an activation of *Hsp40*, *Hsp24* and *Hsp70*, and additionally the activation of detoxification mechanisms [*Cyp4G*]. Again, *P. acuta* showed a different behavior, with inhibition of *Hsp20.4* and a lack of activation of any of the genes related to detoxification processes.

Comet assays demonstrated the ability of Vz to induce DNA damage in both test species, although a significant dose-response relationship for all analyzed parameters [percentage of DNA in tail, length of tail, tail moment and olive moment] was only found in the case of *C. riparius*. Finally, the upregulation of genes involved in DNA repair mechanisms [*ATM* and *XRCC-1*] observed in *C. riparius* demonstrates that this organism is capable of activating said mechanisms, while in the case of *P. acuta*, an inhibition was observed for the analogous genes *ATM* and *XRCC-2*.

In this doctoral thesis, the genotoxic effects of Vz on aquatic insects and mollusks were verified, for the first time linking them to the transcriptional activity of genes involved in DNA repair mechanisms. The results allow us to conclude that Vz can alter key genes in the ecdysone-mediated signaling pathway, suggesting a direct interaction of this contaminant with the endocrine system of insects. In the same way, activation of cell stress targets and detoxification pathways in this group of invertebrates was confirmed that Vz can alter key genes in the ecdysone-mediated signaling pathway of *C. riparius*. The lack of change in endocrine pathway genes, cellular stress and detoxification observed in *P. acuta* brings to light the need to continue exploring other molecular targets that may play a role in the mechanism of action of endocrine disruptors in mollusks. Finally, these results highlight the necessity of using different molecular targets in various representative species from different invertebrate taxa during such studies.



2. Introducción

2.1. Contaminación ambiental

En la actualidad, y como consecuencia del gran desarrollo industrial, se ha incrementado la producción y el uso de nuevos compuestos químicos. Su empleo generalizado hace que durante su fabricación, procesado y distribución, o bien debido a su uso y posterior eliminación, estos productos acaben siendo liberados al medio natural. Muchos de estos compuestos son de difícil degradación, pudiendo persistir durante décadas en el entorno. Los contaminantes ambientales son aquellos productos químicos sintéticos o naturales que se introducen en el medio ambiente y pueden causar efectos adversos ecológicos y/o sobre la salud humana [Geissen et al., 2015]. Entre esos contaminantes existe una amplia diversidad de compuestos sintéticos que abarcan compuestos químicos industriales, productos fitosanitarios [herbicidas, insecticidas y fungicidas], incluso fármacos, y compuestos que aparecen en productos de higiene personal formando lo que se conoce como contaminantes emergentes, además de los metabolitos derivados de dichos compuestos [Murnyak et al., 2011]. El medio acuático y, especialmente, las aguas superficiales juegan un papel fundamental en el transporte de los contaminantes ambientales, favoreciendo su aparición en otras zonas alejadas del punto de vertido, si bien pueden permanecer en el mismo dependiendo de sus propiedades físico-químicas y de los procesos de degradación o disipación. Los contaminantes se integran así en los ecosistemas acuáticos, donde pasan a formar parte de un complejo ciclo en el que están implicados los compartimentos agua y sedimento, así como los organismos vivos. El efecto que causan pueden ser directo o bioacumularse a través de las cadenas tróficas, provocando intoxicación secundaria en la biota y en último término sobre el ser humano. Son cada vez más los estudios que correlacionan la contaminación ambiental y determinadas patologías humanas, entre las que destacan enfermedades neurodegenerativas y respiratorias [Sunyer et al., 2006], y severas alergias [Edwards and Myers, 2007]. Asimismo, existen datos experimentales y epidemiológicos que asocian la exposición continua a sustancias químicas de uso cotidiano [plastificantes, productos fitosanitarios, etc.] con alteraciones del sistema endocrino y del aparato reproductor en el ser humano y en otras especies [Ma et al., 2019], así como con la inducción de algunos tipos de cáncer [Siddique et al., 2016; Yuan et al., 2018].

La ECHA [European Chemicals Agency] ha registrado más de 54 millones de productos químicos industriales y cerca de 43 millones se encuentran disponibles comercialmente. La evaluación de riesgo requerida para la comercialización de este gran número de productos químicos industriales exige el análisis de su posible efecto tóxico mediante el uso de organismos modelo. Los organismos empleados en los estudios de ecotoxicidad acuática pertenecen a tres grupos taxonómicos representativos de la cadena trófica de los ecosistemas acuáticos: algas, invertebrados acuáticos y peces [Flood et al., 2018]. Entre los distintos parámetros empleados, para valorar la toxicidad en algas, destacan las pruebas de inhibición de crecimiento, el análisis de la mortalidad o la inhibición de la bioluminiscencia [ISO, 2012; OECD, 2011a].

2.2. Disruptores endocrinos. El caso de la Vinclozolina

Los disruptores endocrinos [EDC, del inglés *Endocrine Disrupting Chemicals*] son sustancias químicas que se encuentran en el medio ambiente, y que pueden interferir con el sistema endocrino alterando la síntesis, el metabolismo, la unión al receptor o la eliminación de las hormonas que son responsables de la regulación de la homeostasis, la reproducción y el desarrollo en los seres vivos [Barouki, 2017]. Los compuestos catalogados como EDC son un grupo muy heterogéneo de sustancias que incluyen compuestos químicos sintéticos [Figura 1].

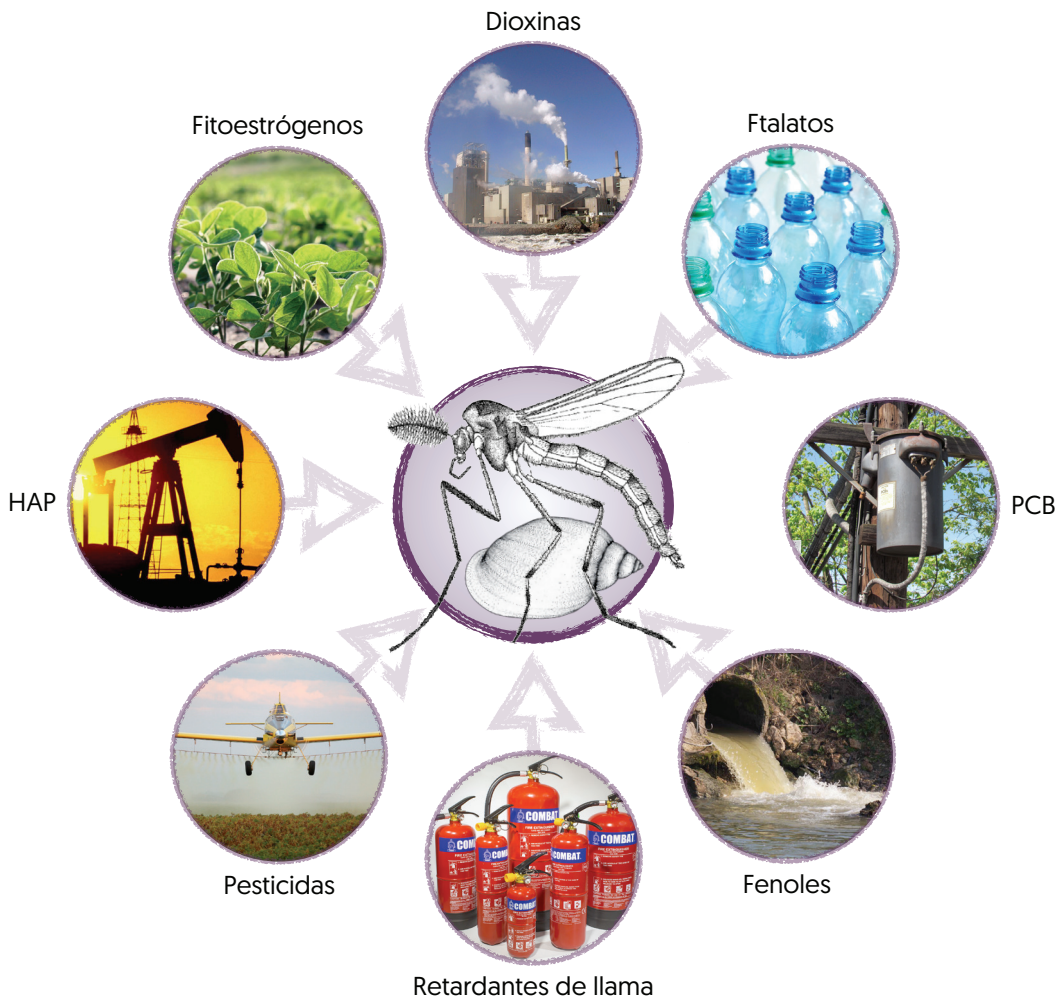


FIGURA 1. Ejemplos de sustancias consideradas como disruptores endocrinos. Hidrocarburos aromáticos policíclicos [HAP], bifenilos policlorados [PCB].

La exposición a estos compuestos se ha relacionado con una mayor incidencia en el ser humano de ciertos cánceres, síndromes metabólicos y enfermedades cardiovasculares [Annamalai and Namasivayam, 2015; Bilal and Iqbal, 2019; Kabir et al., 2015]. Otros efectos relacionados con la exposición a EDC en el ser humano son la reducción de la calidad del esperma, un adelanto de la edad de la pubertad, la reducción de la fecundidad y un mayor aumento de las complicaciones sufridas durante el embarazo [Birnbaum, 2013; Buttke et al., 2012].

Cuando se comenzaron a describir los efectos de los EDC, el único mecanismo de acción que se consideraba era el de unión a receptores nucleares como los receptores de estrógenos, andrógenos, progesterona, tiroideos y de retinoides entre otros [Figura 2]. Sin embargo, hoy día se sabe que los EDC actúan a través de otros tipos de receptores, no nucleares y no esteroideos por medio de distintos mecanismos. De esta forma, el modo de acción de un EDC puede ser:

- Mimetizando la propia actividad biológica de una hormona endógena, uniéndose a un receptor celular [efecto agonista].
- Uniéndose a un receptor sin activarlo, impidiendo que lo hagan las hormonas naturales [efecto antagonista].
- Alterando los niveles de hormonas presentes en el flujo sanguíneo, interfiriendo con las proteínas de transporte.
- Interfiriendo en los procesos metabólicos del organismo, afectando la síntesis o la degradación de las hormonas.
- Modificando la actividad transcripcional de los genes relacionados con hormonas y receptores.

Por lo tanto, y desde una perspectiva fisiológica un EDC es una sustancia natural o sintética capaz de producir una alteración en el sistema endocrino, provocando cambios hormonales y homeostáticos, que permiten al organismo comunicarse y responder a su entorno.

Como se ha mencionado, el grupo de moléculas identificadas como EDC es altamente heterogéneo e incluye sustancias químicas sintéticas con usos muy variados como disolventes, lubricantes industriales y sus subproductos como el bifenilo policlorado [PCB], los bifenilos polibromados [PBB], las dioxinas, los bisfenoles [bisfenol A; bisfenol S; bisfenol F], los plastificantes [ftalatos], los plaguicidas [metoxicloro; diclorodifeniltricloroetano, DDT; clorpirifos, vinclozolina] y los fármacos [dietilestilbestrol, DES]. Se han descrito para los plaguicidas varios mecanismos de disrupción endocrina, como la interferencia con la función de enzimas esteroideogénicas y otras vías que alteran la fosforilación o degradación del receptor de andrógenos [AR, del inglés *Androgen Receptor*], un elemento clave para el desarrollo sexual, y en la progresión de ciertos cánceres dependientes de hormonas. Además se ha observado que las exposiciones a dichos compuestos en el caso del ser humano es principalmente a través de los productos alimenticios ya que, según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA, 2015], en 2013 el 27.3% de las muestras de alimentos analizados de la Unión Europea [UE] mostraban contaminación con más de

un plaguicida. Las exposiciones no se producen de forma aislada, lo que puede llegar a producir efectos acumulativos sobre el sistema endocrino.

La Vinclozolina [Vz] es un fungicida ampliamente usado con fines agrícolas en frutas, verduras, hortalizas y plantas ornamentales. Se ha detectado en aguas superficiales en concentraciones de 0.1 a 2.4 $\mu\text{g/L}$, hasta un máximo de 52 $\mu\text{g/L}$ [El-Shahat et al., 2003]. Tanto la Vz como sus metabolitos, el ácido butanoico [M1] y enalidina [M2], tienen la capacidad de actuar como compuestos antiandrogénicos [Kelce and Wilson, 1997]. Los compuestos catalogados como antiandrogénicos, ejercen sus efectos al actuar directamente sobre los receptores de andrógenos, lo que reduce tanto la síntesis como la circulación de andrógenos [Bilal and Iqbal, 2019]. La unión al receptor es competitiva, bloqueando su activación y/o interfiriendo posteriormente con la expresión de genes regulados por dicho receptor [Rempel and Schlenk, 2008]. Sin embargo, un reciente estudio sugiere que este puede no ser el único modo por el cual los compuestos antiandrogénicos ejercen sus efectos, pudiendo amplificar los efectos feminizantes de los compuestos estrogénicos [Lange et al., 2015].

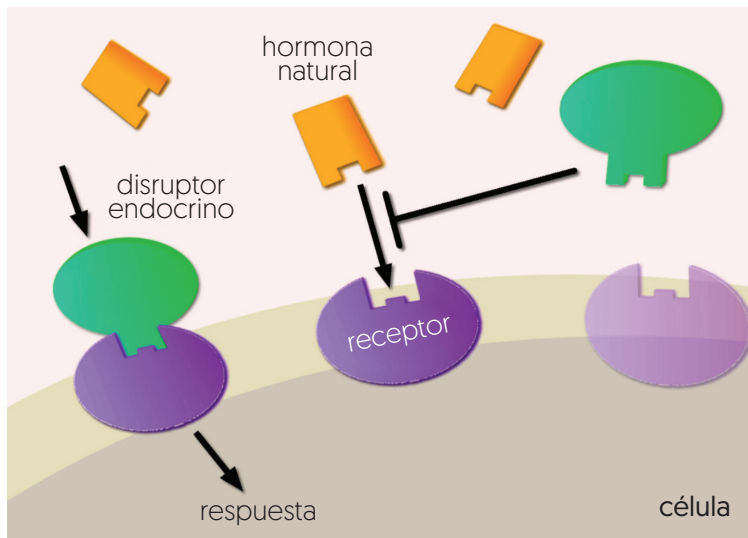


FIGURA 2. Efectos de un disruptor endocrino sobre receptores hormonales. En la imagen se muestran las respuestas que puede desencadenar un disruptor endocrino, que puede ser de aumento del efecto, de disminución, o bien de bloqueo, impidiendo la unión de la hormona y evitando la respuesta normal. Modificado de *European Parliamentary Research Service Blog* [<https://epthinktank.eu/>].

Debido a las propiedades de la Vz como disruptor endocrino, la Comisión Europea prohibió su uso en cultivos dentro de la UE en el marco de la Directiva 91/414/ CEE en 2007. Sin embargo, sigue en uso en cultivos de canola [*Brassica napus*] o en vino en otros países como Estados Unidos o China [EPA Office of Pesticide Programs, 2000; US-EPA, 2000].

Los efectos de la Vz se conocen principalmente en mamíferos. Puede causar daños en la fertilidad y afectar a generaciones futuras, dado que se han descrito efectos transgeneracionales, mediante alteraciones en el epigenoma [Casati et al., 2015; Lee et al., 2018; McCarrey et al., 2016; Paoloni-Giacobino, 2014; Skinner and Anway, 2007; van Ravenzwaay et al., 2013]. Así mismo se puede clasificar como sustancia química del grupo C [US-EPA, 2000], es decir como posible carcinógeno humano de acuerdo con estudios crónicos y de carcinogenicidad en vertebrados, donde se ha observado un aumento de células tumorales, relacionadas con la actividad antiandrogénica del compuesto. El mecanismo de acción de la Vz es de antagonista del receptor de andrógenos, produciendo la demasculinización en la descendencia de ratas expuestas a 100 y 200 mg/Kg peso corporal/día gestacional hasta el posnatal, observables como alteraciones en el desarrollo/crecimiento de la próstata y la alteración de la expresión de genes que se encuentran mediados por andrógenos en tejidos de adultos [Kelce and Wilson, 1997]. En otros estudios sobre la descendencia femenina de ratas expuestas a 1 mg/Kg de peso corporal/día de Vz se observó que durante el embarazo se producían alteraciones, que suponían un aumento en la ramificación epitelial y pérdida de epitelio celular en el día postnatal 35 en las glándulas mamarias femeninas [Robitaille et al., 2015]. Se han descrito también alteraciones como la disminución en la distancia anogenital, efectos sobre glándulas accesorias [disminución o ausencia], testículos no descendidos, etc. [Gray et al., 2001].

2.3. Ensayos ecotoxicológicos con invertebrados acuáticos

La ECHA ha clasificado la Vz como tóxica para la vida acuática con efectos a largo plazo. Sin embargo, la información de la que se dispone en invertebrados es muy limitada en comparación con los estudios en vertebrados [Matthiessen et al., 2017]. Sus efectos no se han evaluado en insectos y en moluscos, aunque sí en otros invertebrados como los artrópodos *Hyalella azteca*, *Acartia tonsa* o *Porcellio scaber* [Lemos et al., 2010a; Watermann et al., 2016; Wu et al., 2014]. Dentro de los invertebrados se incluye una gran variedad de grupos que tienen importantes funciones ecológicas y de interés económico, entre las que destacan aquellas especies que intervienen en la transferencia de nutrientes de la cadena trófica, dado que son una fuente de alimento para muchos vertebrados. Por otro lado, los invertebrados son organismos ubicuos y presentan gran biodiversidad, lo que les convierte en los organismos idóneos para realizar pruebas de ecotoxicidad.

El uso de invertebrados acuáticos en Ecotoxicología ha adquirido una gran importancia debido a sus cortos ciclos de vida en comparación con vertebrados. Esto permite minimizar el tiempo necesario para la obtención de resultados, además de requerir menor equipamiento, no existen implicaciones bioéticas en su uso con fines científicos constituyendo una alternativa a la experimentación animal con vertebrados. Las especies utilizadas son *Daphnia Magnia* [Arthropoda, Branchiopoda] [OECD, 2012, 2004a] *Hyalella azteca* [Crustacea, Amphipoda], *Physa acuta* [Mollusca, Gastropoda], *Chironomus tentans* y *Chironomus riparius* [Insecta, Diptera] [Bandow and Weltje, 2012; OECD, 2010, 2004b, 2004c], algunas de ellas empleadas como organismos de referencia [USEPA, 2000; OECD, 2004].

Entre los ensayos orientados a la evaluación toxicológica de sustancias químicas en medios acuáticos, la familia de los quironómidos, cuenta con cuatro ensayos estandarizados [OECD, 2011b, 2010, 2004c, 2004b]. En todos ellos se utilizan individuos a los que se les somete a exposiciones agudas y/o crónicas de compuestos químicos, en columna de agua o formando parte del sedimento en el que se desarrollan. Entre los diversos parámetros analizados, se encuentran el porcentaje de huevos que llegan a eclosionar, la mortalidad/supervivencia de larvas, la duración del desarrollo, el peso de las larvas, la reproducción, o el ratio machos y hembras. No obstante en el caso de moluscos no hay ensayos estandarizados para *Physa acuta*, aunque se pueden aplicar los dos ensayos de la OECD con las especies, *Potamopyrgus antipodorum*, y *Lymnaea stagnalis* [especie muy parecida a *Physa*], en las que los parámetros analizados son mortalidad/supervivencia de individuos, duración del desarrollo, reproducción, y/o crecimiento (longitud de la concha).

En el presente trabajo de investigación se aborda el estudio de los efectos de la Vz, empleando como modelos experimentales embriones y larvas de *C. riparius* y adultos de *P. acuta*, mediante la aplicación de diferentes metodologías moleculares, bioquímicas y celulares, y fisiológicas entre los que se encuentran el análisis de los niveles de expresión génica, el análisis de la genotoxicidad [mediante el ensayo cometa], los ensayos de supervivencia, de reproducción y de embriotoxicidad.

2.3.1. *Chironomus riparius*

Los quironómidos [Diptera, Chironomidae] pertenecen a una de las familias de dípteros más abundantes en los sistemas acuáticos, siendo también mayoritarios entre los macroinvertebrados de ecosistemas de agua dulce [Rasmussen, 1985]. Son uno de los elementos clave en la cadena trófica de estos ecosistemas [Berg and Hellenthal, 1992] al ser un componente importante de la dieta de numerosas especies de peces y aves acuáticas [Prat and Rieradevall, 1995]. 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 [OECD, 2010, 2004b, 2004c]. Una de estas especies, *C. riparius*, se utiliza de forma habitual en estudios de ecotoxicología. Es un mosquito cuyas tres primeras fases del ciclo de vida son acuáticas: embrión, larva con cuatro estadios diferenciados y la pupa.

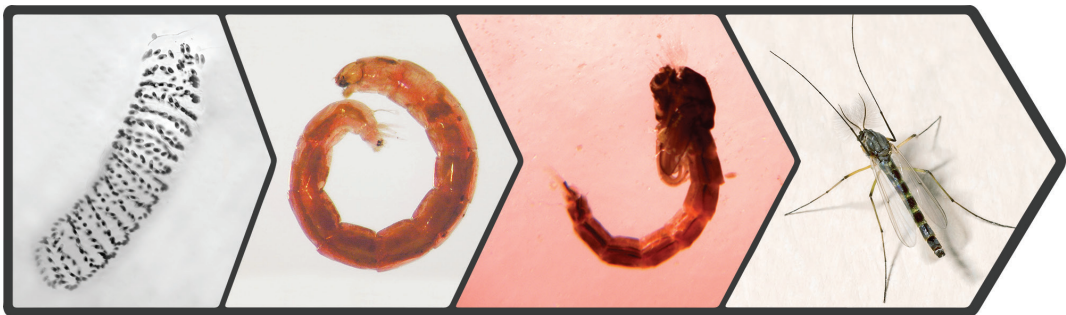


FIGURA 3. Ciclo de vida de *C. riparius*. Las imágenes representan distintas etapas del mismo. De izquierda a derecha: masa de huevos, larva de cuarto estadio, pupa y un mosquito adulto.

Tras una metamorfosis controlada hormonalmente, que permite un cambio drástico morfológico y fisiológico, se convierten en adultos aéreos [Figura 3]. Los adultos, que son la fase encargada de la reproducción, emergen de 15 a 17 días tras la eclosión y viven en torno a cuatro días. Además y bajo condiciones de laboratorio, los machos emergen de 24 a 48 horas antes que las hembras, fenómeno que es conocido como protandria.

2.3.2. *Physa acuta*

Los gasterópodos acuáticos son miembros ubicuos de las comunidades de agua dulce y juegan un papel muy importante en los ecosistemas acuáticos, puesto que se consideran buenos indicadores de la salud de dichos ecosistemas. Representan entre el 20% y el 60% de los macroinvertebrados en los ecosistemas acuáticos de agua dulce [Habdija et al., 1995] y se ha demostrado que los moluscos son sensibles a una amplia gama de contaminantes ambientales, incluyendo a los EDC. La necesidad de desarrollar protocolos estandarizados utilizando especies de moluscos se ha puesto de manifiesto por algunos autores [Bandow and Weltje, 2012; OECD, 2014], por lo que la OECD ha incluido entre sus bioensayos estandarizados con organismos acuáticos, dos guías con caracoles de agua dulce: *P. antipodorum*, una especie que se reproduce por partenogénesis [OECD, 2016a], y *L. stagnalis* una especie con reproducción sexual hermafrodita [OECD, 2016b].

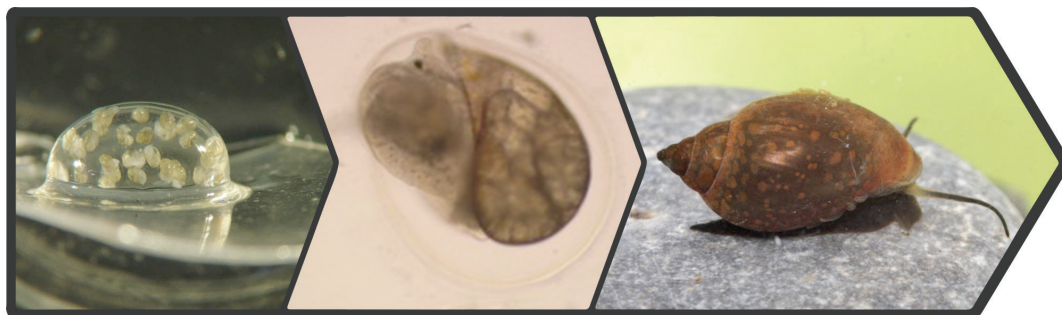


FIGURA 4. Ciclo de vida de *P. acuta*. Las imágenes representan distintas etapas del mismo. De izquierda a derecha, embriones, un juvenil, y un adulto.

En este sentido, *P. acuta* [también conocida como *Physella acuta*] es una especie de gasterópodo hermafrodita pulmonado muy parecido a *L. stagnalis* distribuida por todo el mundo [Albrecht et al., 2009]. La duración de su ciclo de vida en condiciones de laboratorio es de 5 a 6 meses [Sánchez-Argüello et al., 2009], considerándose que alcanzan la madurez sexual tras la primera ovoposición, a las diez semanas [Figura 4]. En la actualidad, no hay ensayos estandarizados para *P. acuta*, aunque se pueden emplear los dos ensayos de la OECD anteriormente citados.

2.4. Biomarcadores moleculares

Un biomarcador es todo indicador interno ponderable en un organismo. A nivel molecular hace referencia a cualquier cambio genético, proteico, lipídico o glucídico que tiene lugar en el organismo vivo. Por ello son una herramienta fundamental a la hora de valorar la respuesta frente exposición a un compuesto tóxico. La modificación de los patrones de expresión génica puede considerarse como un evento que inicia una respuesta en cascada. Por tanto los biomarcadores de expresión génica permiten detectar una respuesta temprana en el organismo tras su exposición a un contaminante y ayudar a descifrar su mecanismo de acción [Kim et al., 2015].

2.4.1. Biomarcadores de expresión génica del sistema endocrino

La regulación hormonal es una característica común a la mayoría de los animales pluricelulares. Mientras que las funciones básicas de regulación endocrina de los procesos biológicos se han conservado, los componentes específicos del sistema endocrino de diversos grupos han experimentado una divergencia evolutiva significativa que resulta en diferencias claras entre los taxones. Los invertebrados exhiben una amplia variedad de sistemas de señalización, siendo únicos en algunos casos, o con hormonas similares a las de vertebrados, al menos parcialmente, como los moluscos o iguales como los equinodermos. A rasgos generales el sistema endocrino de invertebrados regula los mismos procesos que en vertebrados, como son el desarrollo, el crecimiento y la reproducción, aunque cabe destacar estadios como la pupa, o eventos como la metamorfosis de máxima relevancia y variedad en invertebrados.

Uno de los sistemas hormonales mejor caracterizados en invertebrados es el de insectos, debido al interés económico y ecológico que suscita este grupo.

Como se ha comentado, las hormonas y el sistema endocrino de invertebrados no son completamente análogos a los de vertebrados. Si comparamos ambos sistemas endocrinos, el sistema hormonal de invertebrados presenta mucha más diversidad en función del grupo que se trate [Taenzler et al., 2007]. En los insectos las hormonas juegan un papel importante a lo largo de todo el ciclo de vida de los insectos [Tassou and Schulz, 2009]. Los insectos holometábolos [entre los que se encuentran los dípteros], son aquellos que experimentan crecimiento y metamorfosis completa desde el huevo hasta el estado adulto y su regulación hormonal se coordina principalmente por la hormona juvenil [HJ] y hormonas de tipo ecdisoesteroides [Bender et al., 1997]. Estos insectos atraviesan diferentes estados larvarios [estadios] hasta que alcanzan el estado de pupa o metamorfosis, momento en el que se producen importantes cambios a nivel fisiológico y morfológico, que culminan con la madurez sexual del individuo adulto. Cada transición entre estadios va precedida por picos de liberación de una hormona denominada ecdisona. Asimismo, que la larva mude o sufra metamorfosis viene determinado por el tiempo durante el cual se libera ecdisona y por la ausencia o presencia de la HJ [Berger et al., 1992; Riddiford, 1978].

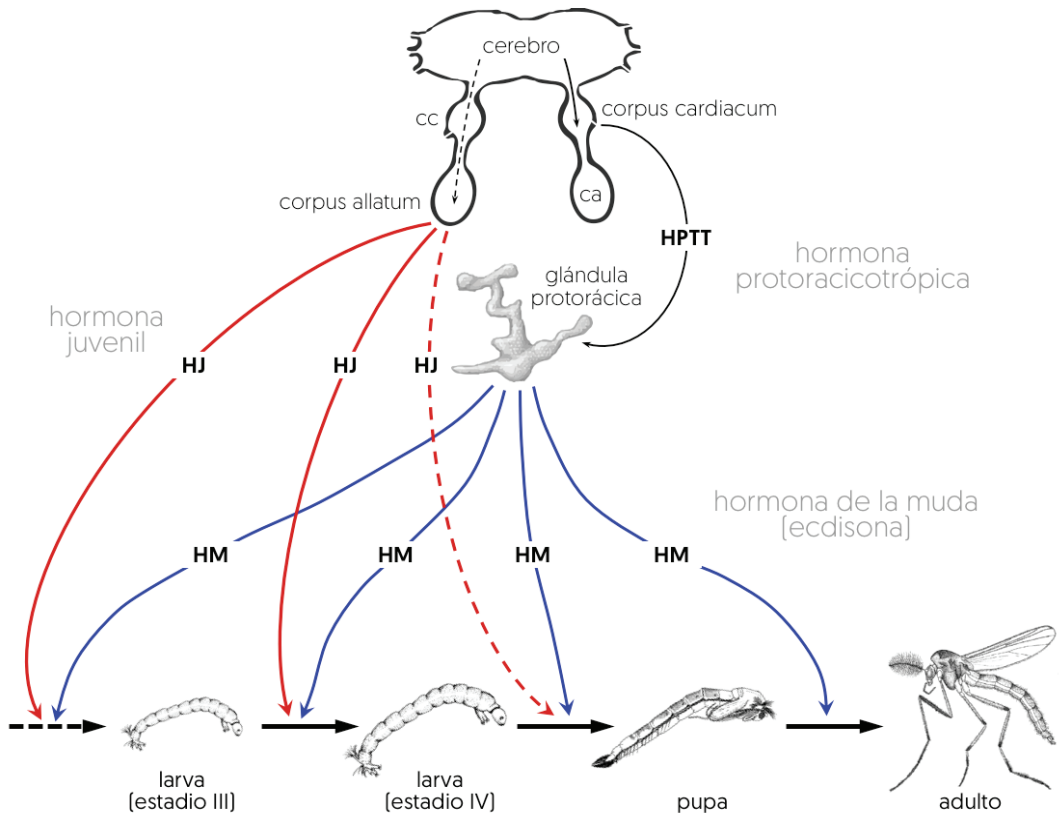


FIGURA 5. Esquema general de la producción de hormonas y su papel en el desarrollo de insectos. Imágenes modificadas de Cranston [2012] y Cooper et al. [2009].

La muda y la metamorfosis de los insectos implican una transformación radical que requiere de una extensa variedad de cambios en el patrón de expresión génica. Estos cambios resumidos en la Figura 5, son coordinados y sincronizados mediante hormonas ecdisoesteroideas como la ecdisona. De manera resumida, bajo determinados estímulos [fotoperiodo, temperatura, estado nutricional, etc.] las células neurosecretoras presentes en los ganglios cerebrales, aumentan la síntesis de hormona protoracicotrópica [HPTT]. La HPTT se transporta a través de los axones de estas células hasta el par de glándulas endocrinas que conforman el *corpus cardiacum*, desde donde se libera a la hemolinfa. Un segundo par de glándulas, las denominadas *corpus allatum*, se encargan de la secreción de la HJ que inhibe la metamorfosis hasta que el desarrollo larvario se completa, alcanzando su máxima concentración durante el inicio de la vida larvaria y 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. Muchos de los efectos de la HJ dependen de su receptor intracelular *MET* [del inglés *methoprene tolerant*] que actúa como regulador transcripcional uniéndose a los promotores de los genes diana de la HJ cuando esta se encuentra presente [Ojani et al., 2016]; es decir, actúa como receptor de dicha hormona [Charles et al., 2011]. Una vez en la hemolinfa, la

HPTT alcanza las glándulas protorácicas y activa la síntesis de la hormona de la muda [HM] o ecdisona a partir de moléculas de colesterol. La ecdisona se libera de forma inactiva y requiere que se active en los tejidos periféricos en su metabolito activo 20-hidroxiecdisona [20 E], que es la que se une a su receptor nuclear específico [EcR, del inglés *Ecdysone Receptor*], formando un heterodímero al unirse a la proteína ultraespiráculo [USP, del inglés *Ultraspiracle*]. Esto da lugar al receptor funcional que desencadena los procesos de muda [cuando simultáneamente se dan altos niveles de HJ, que se une específicamente al USP] o metamorfosis [con bajos niveles de HJ].

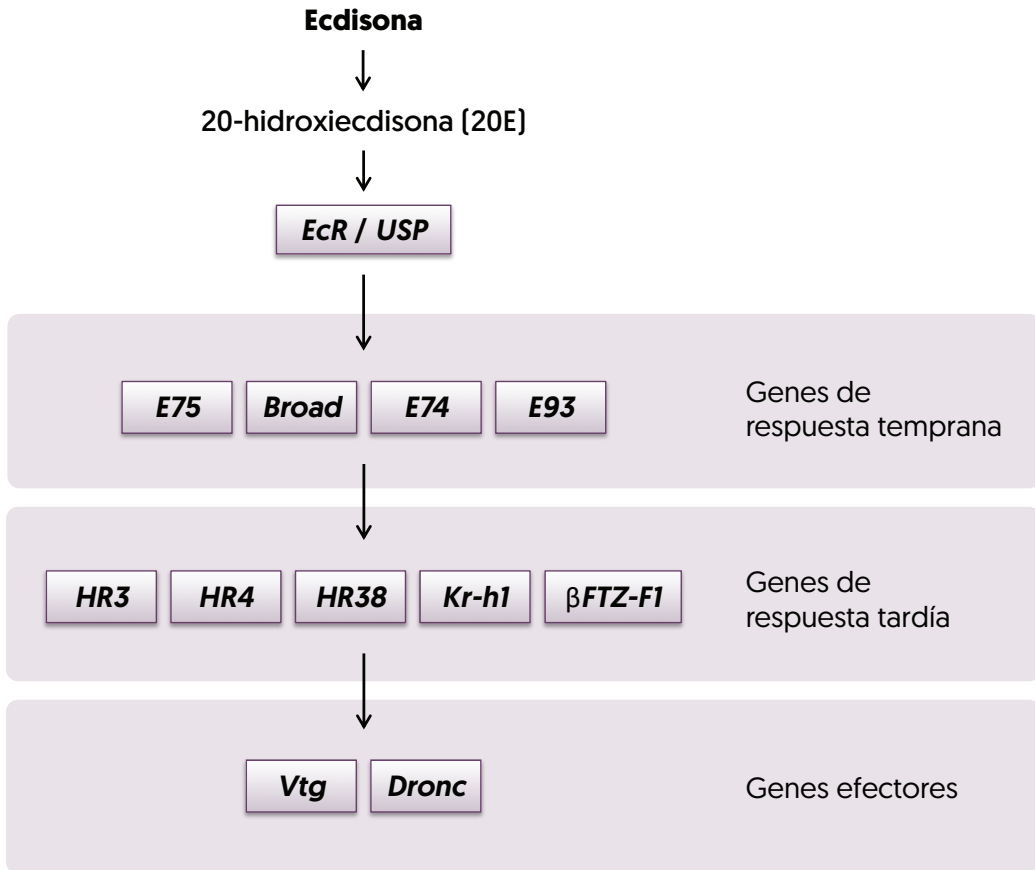


FIGURA 6. Ruta hormonal de la ecdisona. La unión de la ecdisona al heterodímero EcR/USP constituye el inicio de la cascada de transcripción. Se muestran en cajas los principales genes involucrados en la ruta de la ecdisona.

A nivel celular, como se muestra en la Figura 6, el mecanismo de respuesta a la ecdisona implica un proceso en cascada en el que el EcR, una vez activado por la hormona, actúa como un factor de transcripción uniéndose al promotor de los genes que codifican para proteínas que actúan como factores de transcripción temprana. Estos a su vez, interaccionan con los promotores de otros genes activando la cascada de cambios en la expresión de genes de respuesta tardía y desencadenando, a su

vez, cambios en la expresión de genes efectores. Estos últimos son los responsables de las transformaciones a nivel morfológico, fisiológico y de comportamiento producidos durante el desarrollo de los insectos [Yamanaka et al., 2013].

El descubrimiento de los fenómenos de *imposex* e *intersex* en moluscos [Lima et al., 2011; Stange et al., 2012] demuestra la excepcional respuesta a EDC de este grupo taxonómico. Sin embargo, existen importantes lagunas sobre su sistema endocrino.

En vertebrados, los estrógenos se regulan a través de receptores nucleares, como es el caso de los receptores de estrógenos [ER, del inglés *Estrogen Receptors*] y otros receptores denominados receptores huérfanos, dado que no se conoce su ligando. Los ER, descritos son un grupo de proteínas que unen compuestos esteroideos que pertenecen a la familia de receptores nucleares. Su importancia radica en el papel que tienen en el ciclo reproductivo, funcionando como receptores de la principal hormona sexual femenina, uniéndose a estrógenos y actuando como factores de transcripción y, por tanto, interactuando con elementos específicos de diferentes genes que inducen diversos efectos. Los distintos tipos de ER, se encuentran en tejidos reproductivos y no reproductivos y se sabe que están involucrados en procesos relacionados con el desarrollo y la reproducción. En peces se han encontrado tres subtipos de ER [ER α y ER β] [Kajiwara et al., 2006], que se expresan en gónadas masculinas, femeninas y en cerebro, lo que los relacionaría con la regulación de la reproducción y el comportamiento. Recientemente se han descrito ortólogos de estos ER en moluscos como *Aplysia californica* [Thornton et al., 2003], o *Thais clavigera* [Kajiwara et al., 2006]. Sin embargo, hoy en día se desconoce si dichos receptores de estrógenos pueden estar relacionados con la regulación de la reproducción.

Así mismo, junto con los ER, los receptores relacionados con estrógenos [ERR, del inglés *Estrogen Related Receptors*] forman una superfamilia de receptores, aunque el ligando de ERR es desconocido. Ambos receptores se han encontrado en diversas especies del reino animal, aunque su presencia de manera simultánea sólo se ha descrito en dos especies de gasterópodos [Giguère, 2002]. Los sistemas hormonales de moluscos parecen ser únicos entre las especies de invertebrados, pudiendo llegar a ser en cierta medida parecidos a los de los vertebrados [Thornton et al., 2003], especialmente con respecto a las hormonas esteroides. En el presente trabajo se ha estudiado el ER, dado que es el principal receptor hormonal descrito y analizado en otras especies de caracoles, como *T. clavigera*, *Nucella lapillus*, *Potamopyrgus antipodarum* y *Bithynia tentaculata* [Castro et al., 2007; Hultin et al., 2014; Kajiwara et al., 2006; Stange et al., 2012]. Además de jugar un papel crucial en la reproducción y el desarrollo, es el principal mediador de la alteración endocrina causada por contaminantes xenobióticos con capacidad de imitar o bloquear la propia acción del estrógeno.

Por otro lado, la Hsp90 participa en numerosos procesos celulares entre los que se incluyen el correcto plegamiento de proteínas, el transporte intracelular, la degradación de proteínas, así como la facilitación de la señalización celular, aunque también se ha descrito su relación con receptores de esteroides [Pratt and Toft, 1997]. Además, se ha relacionado la Hsp90 con la maduración de

receptores nucleares y el funcionamiento adecuado de receptores esteroides, incluidos los responsables de la unión de la aldosterona, andrógenos, estrógenos y progesterona [Sanchez, 2011]. Por ello, resulta de gran interés su análisis a la hora de poder correlacionar procesos como el plegamiento de proteínas y la unión a receptores esteroides.

2.4.2. Biomarcadores de expresión génica de proteínas de choque/estrés celular, detoxicación y daño en el ADN

La respuesta de choque o de estrés celular, implica la inducción de un conjunto de proteínas conocidas como proteínas de estrés o proteínas de choque térmico [HSP, del inglés *Heat Shock Proteins*]. Se activan para contrarrestar posibles daños fisiológicos producidos por agentes físicos, químicos o frente a cambios ambientales [Lindquist and Craig, 1988]. Se pueden agrupar las HSP de acuerdo a su homología de secuencia y de su peso molecular en cinco grandes familias: Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 y HSP de bajo peso molecular. A nivel celular las HSP están involucradas en el correcto mantenimiento de la homeostasis a nivel proteico, y en la protección celular frente a una respuesta de emergencia. Son numerosos los estudios que han demostrado que no sólo estímulos como los cambios de temperatura son capaces de desencadenar dicha respuesta, sino que existen otros estímulos como la exposición a contaminantes, que pueden inducir una respuesta en los niveles de dichas HSP, por ello, son llamadas también “proteínas de estrés” y consideradas biomarcadores de exposición a tóxicos [Bednarek et al., 2016; Elyse Ireland et al., 2004].

Entre las de mayor peso molecular destaca la familia de las Hsp70, una de las más conservadas a nivel evolutivo y que ha recibido más atención. Esta familia incluye diversos miembros que actúan como chaperonas interactuando con diversos tipos de proteínas para ayudar en su proceso de plegamiento [Ghazaei, 2017]. Los miembros de esta familia se inducen bajo una amplia variedad de condiciones de estrés y evitan la formación de configuraciones de proteínas incorrectas que podrían generar moléculas dañadas [Mayer and Bukau, 2005].

Por otro lado, la Hsp90 participa en muchos procesos celulares más allá del plegamiento de proteínas, entre los que se encuentran la reparación del ADN, el desarrollo y la respuesta inmune [Pennisi et al., 2015]. A diferencia de otras chaperonas, la Hsp90 no se requiere para el plegamiento de proteínas *de novo*, sino que facilita la maduración final de proteínas específicas. Por ello, la Hsp90 juega un papel clave en la ordenación espacial y temporal de las interacciones de las proteínas, garantizando el correcto ensamblaje de proteínas [Pennisi et al., 2015]. Por otro lado el gen *GP93* (del inglés *glycoprotein 93*), codifica para la glicoproteína 93, una proteína relacionada con la Hsp90 [Maynard et al., 2010] ortólogo de la glicoproteína 93, una proteína esencial para el desarrollo temprano en mamíferos [Chen et al., 2014] y que participa en el plegamiento de la integrina y los receptores similares a TOLL que constituyen una familia de proteínas que forman parte del sistema inmunitario y receptores similares a estrógenos [ER] [Morales et al., 2009].

Las HSP de bajo peso molecular tienen un peso molecular comprendido entre 10 y 30 KDa y, a diferencia de otras HSP, poseen mayor diversidad de secuencia. Están implicadas en procesos biológicos como el crecimiento celular, apoptosis, diferenciación celular, diapausa o la fluidez de la membrana plasmática entre otros [Arrigo, 1998; Gkouvtzas et al., 2008; Hao et al., 2007; Morrow et al., 2004; Tsvetkova et al., 2002].

Cuando un xenobiótico entra en el organismo, se desencadenan una serie de reacciones a nivel celular para favorecer su metabolización y o eliminación y prevenir sus posibles efectos tóxicos. Este proceso persigue obtener sustancias hidrosolubles que sean fácilmente excretables. Se distinguen tres fases bien diferenciadas: Fase I, Fase II y Fase III. En la Fase I, se producen reacciones químicas de distinta naturaleza [reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis] cuyo resultado es la modificación a nivel molecular del xenobiótico, dando lugar a la aparición de nuevos grupos funcionales. Dentro de las enzimas que actúan en esta fase, destacan los citocromos P450 [CYP], que catalizan una amplia variedad de reacciones enzimáticas, principalmente debido a la gran diversidad genética de *CYP*. Además tienen una baja especificidad por el sustrato, lo que permite metabolizar gran cantidad de productos xenobióticos diferentes [Schuetz, 2001]. Si los metabolitos resultantes son lo suficientemente polares, pueden ser fácilmente excretados. Sin embargo, los productos del metabolismo de otros compuestos xenobióticos que no pueden eliminarse en esta primera fase, pasan a la Fase II [Figura 7]. En este caso el principal objetivo es la conjugación con moléculas como el glutatión o el ácido glucurónico, lo que aumenta la solubilidad del producto y por tanto favorece su excreción. Las enzimas glutatión S-transferasas [GST] son responsables de la conjugación del glutatión y también participan en la reducción del estrés oxidativo causado por los radicales libres de oxígeno [Jancova et al., 2010]. Las GST citosólicas se clasifican en seis clases: Delta, Épsilon, Omega, Sigma, Theta y Zeta, siendo las dos primeras específicas de insectos [Ding et al., 2003]. Finalmente, la Fase III involucra transportadores de flujo de salida como los transportadores ABC [de *ATP-binding cassette*] [Dermauw and Van Leeuwen, 2014] que bombean los compuestos modificados fuera de las células.



FIGURA 7. Principales etapas del sistema de detoxificación celular.

La estabilidad del genoma resulta crucial tanto para mantener la homeostasis celular como para garantizar la continuidad genética durante la proliferación celular y la reproducción de los organismos multicelulares. Las rutas principales de respuesta a estrés que se activan para mantener la homeostasis son relativamente limitadas. Entre estas rutas se incluye la respuesta de daño al ADN. El ADN tiene una estructura

dinámica sujeta a cambios constantes, que pueden llegar a originar alteraciones [mutaciones], modificando así la información genética de los organismos. Dichos cambios pueden surgir de forma espontánea debidos a procesos básicos del metabolismo celular, a errores en la replicación o recombinación, o pueden ser inducidos por agentes exógenos de tipo físico, químico o biológico. Hay compuestos que tienen actividad genotóxica al afectar al ADN, bien directa o indirectamente. La producción de radicales libres, por ejemplo, tiene como efectos secundarios la peroxidación lipídica y el daño al ADN. Una de las reacciones de la célula a estos efectos es la activación de los mecanismos de reparación del ADN. Por ello resulta crucial la capacidad que tienen las células para reparar el daño producido. Durante los últimos años, se ha incrementado el conocimiento de los mecanismos de reparación en diferentes organismos, poniéndose de manifiesto su elevada conservación en la escala evolutiva. En este sentido, los organismos han desarrollado diversos sistemas para responder al daño ocasionado en el ADN, que abarca desde la reversión directa del daño mediada por fotoliasas y alquiltransferasas, escisión de bases o nucleótidos, reparación de apareamientos erróneos o reparación de roturas de doble cadena.

Además de los procesos de reparación anteriormente mencionados, también se han identificado multitud de genes implicados en la respuesta al daño al ADN, por ello el estudio del efecto que un compuesto tiene en la alteración de la expresión génica de genes directamente relacionados con la señalización del daño al ADN ayuda a caracterizar la vía en la que preferentemente actúa, representando una herramienta útil a la hora de determinar su posible mecanismo de acción. En el presente trabajo se ha analizado la actividad transcripcional de diversos genes, relacionados con los procesos de detección y reparación de roturas de cadena simple o de doble cadena en el ADN involucrados en el proceso de reparación del ADN o en caso de no reparación de genes que activan la apoptosis. El gen *ATM* [del inglés *ataxia-telangiectasia mutated*] codifica la proteína ATM, una quinasa de serina/treonina implicada en la regulación de los procesos de control de la división celular y en la reparación de daños sufridos frente a roturas de doble cadena en el ADN [Guleria and Chandna, 2016; IJIMA et al., 2008]. Por su parte, el gen *ATR* [*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*] también pertenece a la familia de proteínas quinasas relacionadas con la fosfatidilinositol 3-quinasa, pero interviene en la respuesta a roturas de una sola hebra. Los procesos de daño al ADN se relacionan con la apoptosis ya que, si la célula no es capaz de reparar el ADN, puede activar la apoptosis para evitar mayores implicaciones en el organismo. Por esta razón es de interés el análisis de genes que señalicen procesos apoptóticos como es el caso de *DECAY* [*death executioner caspase related to Apopain/Yama*] [Dorstyn et al., 1999]. Otro gen relacionado con la apoptosis es *NLK* [*Nemo Like Kinase*]. Este gen codifica para una proteína quinasa, implicada en el desarrollo, proliferación y regulación de la apoptosis [requerido para la activación de p53 en respuesta al daño del ADN]. O el caso de la *CASP3* [del inglés, *cysteine-aspartic acid protease*], que pertenece al grupo de las caspasas efectoras o ejecutoras [Rupinder et al., 2007]. En concreto, guarda relación con la fragmentación del ADN, la degradación del citoesqueleto y la formación de cuerpos apoptóticos [Taylor et al., 2008]. La proteína Rad-1, por su parte, codifica para un gen que detiene la progresión celular en respuesta al daño monocatenario del ADN. *XPA-1* [*Xeroderma*

Pigmentosum A1), codifica para una proteína con dedo de zinc que es parte del complejo de reparación por escisión de nucleótidos del ADN dañado por carcinógenos y agentes físicos como la radiación ultravioleta. Por último los genes *XRCC-1*, *XRCC-2* y *XRCC-4* [del inglés *X-Ray Repair Cross Complementing 1, 2 y 4*] se encuentran involucrados en la reparación de roturas de una hebra [*XRCC-1*] y hebra doble [*XRCC-2* y *XRCC-4*] del ADN mediante recombinación homóloga [Brem and Hall, 2005; London, 2015; Tambini et al., 2010].

2.4.3. Biomarcadores génicos polisomales

El proceso que conduce a la expresión génica, se produce a través de varios mecanismos reguladores para cada fase, desde la transcripción, traducción y posteriores modificaciones postraduccionales. La síntesis de proteínas está mediada por el ribosoma, que es un gran complejo ribonucleoproteico, compuesto por cuatro ARN ribosómicos y 79 proteínas ribosómicas [RP]. Los ribosomas se estructuran en dos subunidades, denominadas subunidad ribosomal grande [60S] y pequeña [40S] [King and Gerber, 2014] [Figura 8]. Hasta la fecha, son numerosos los estudios transcripcionales para comprender la expresión génica. Sin embargo, existe una descompensación entre los niveles hayados de ARNm y de proteínas, lo que sugiere que los pasos de traducción y postraduccion también son una parte importante de la regulación [Maier et al., 2009]. Durante la última década, ha habido un interés creciente en el papel que tiene la regulación de la traducción en la expresión génica de muchos organismos. En este sentido, el perfil polisomal, nos aproxima al estado de la traducción, es decir, el subconjunto de ARNm traducido activamente en una célula. Distintos estudios, correlacionan la eficiencia de traducción en respuesta a diversos estímulos, como la temperatura [Matsuura et al., 2010], la deshidratación [Kawaguchi et al., 2004], la exposición a pesticidas o las condiciones de estrés ambiental [Bernabò et al., 2015; Lencioni et al., 2016].

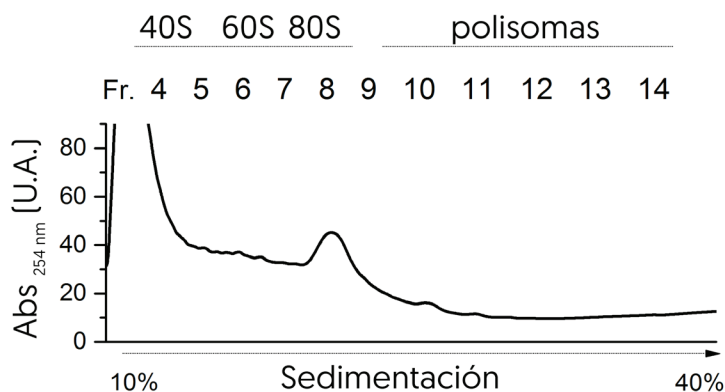


FIGURA 8. Perfil polisomal obtenido en un gradiente de sacarosa de 10-40% leído a 254 nm de absorción UV.

La regulación de la síntesis de proteínas [traducción] resulta clave para el correcto funcionamiento celular, dado que consume más del 50% de la energía celular. No obstante el estudio a nivel traduccional de la expresión génica es un terreno prácticamente desconocido en invertebrados, centrándose la mayoría de los estudios en el nivel transcripcional, dada la falta de técnicas confiables para la descripción a nivel proteico. De hecho, los análisis de *Western Blot* a menudo conllevan a resultados poco fiables, debido a la falta de anticuerpos específicos. En este sentido la purificación e identificación de los ARNm asociados a ribosomas o polisomas, representan un enfoque alternativo para el estudio de proteínas traducidas, dado que nos permiten medir la asociación de los ribosomas con los ARNm traducidos activamente, lo que permite un estudio más detallado de la expresión génica.

El principal objetivo de la extracción polisomal es estudiar y cuantificar la traducción de ARNm específico. El principio de la técnica es capturar la traducción del ARNm mediante la “congelación” de la traducción activa de los ribosomas en diferentes transcripciones y separar los polirribosomas resultantes mediante una ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa, permitiendo así una distinción entre transcripciones [unidas por varios ribosomas] y mal traducidas [unidas por uno o dos ribosomas] [Bernabò et al., 2017, 2015]. Por lo tanto, la técnica nos permite estudiar la traducción frente a condiciones de estrés que afecten a la síntesis de proteínas. Una vez extraídos los polirribosomas el análisis se puede realizar por medio de PCR en Tiempo Real, de manera similar a como se analizan los cambios en los niveles de transcripción.

2.5. Valoración del daño en el ADN. Ensayo cometa

La evaluación de la genotoxicidad, es un requisito indispensable en la caracterización toxicológica de una sustancia química. Desde hace varias décadas, el ensayo cometa o electroforesis alcalina de células individuales, se ha convertido en un método establecido para el estudio del daño al ADN, con múltiples aplicaciones en ensayos de genotoxicidad, estudios de biomonitorio, epidemiología molecular y ecotoxicología; así como una herramienta fundamental para investigaciones sobre daño y reparación del ADN [Møller, 2018]. Se trata de un ensayo simple, versátil rápido y económico, basado en la visualización microscópica del ADN tras embeber las células en agarosa, lisarlas y someterlas a una electroforesis alcalina. Esta metodología básica ha sido mejorada, permitiendo detectar con alta sensibilidad una gran variedad de daños del ADN en cualquier tipo de células, tanto de forma cualitativa como cuantitativa en cualquier tipo de célula eucariota. Las células con un incremento en su ADN dañado presentan una mayor migración del ADN o bien, una mayor intensidad de fluorescencia con respecto a las células normales. La evaluación del daño al ADN mediante en ensayo cometa, se puede medir empleando diferentes parámetros. El porcentaje de ADN en cola es el parámetro más utilizado en estudios de genotoxicidad dado que muestra el daño total producido por el compuesto [ver Figura 9] [Lee and Steinert, 2003].

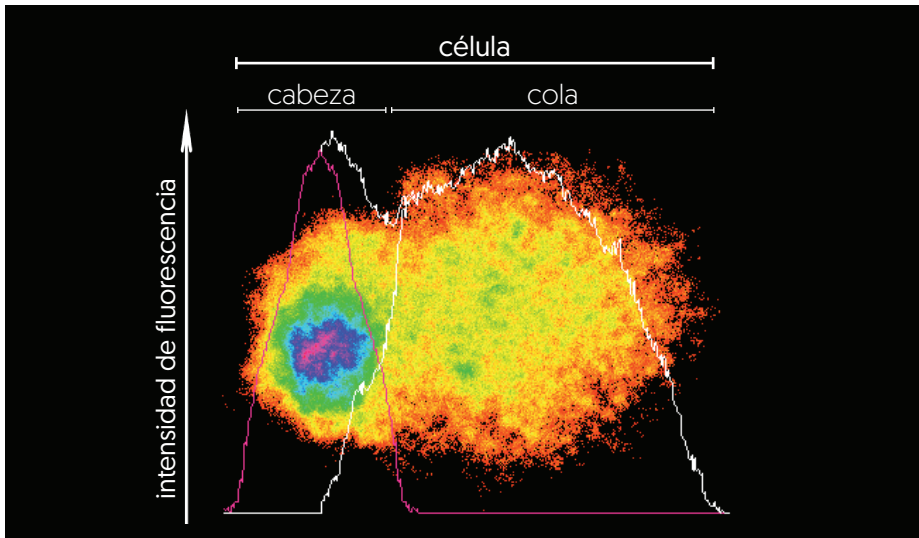
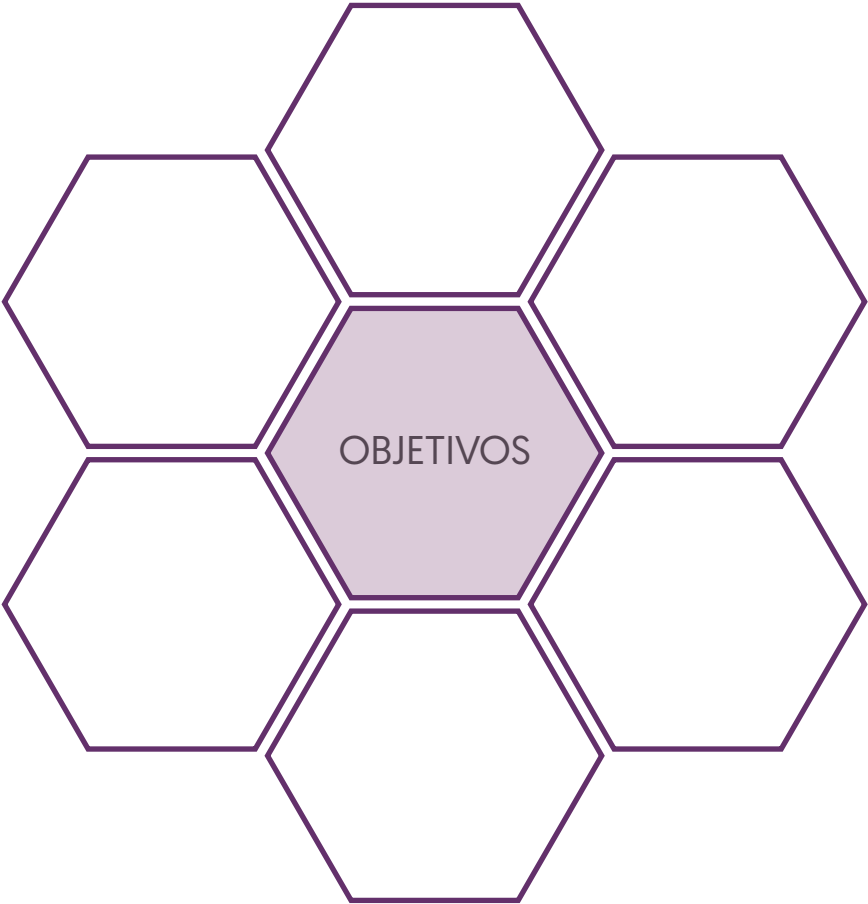


FIGURA 9. Imagen de una célula procesada con el programa Comet Score™, donde se diferencian la cabeza y la cola del cometa.

El ensayo cometa realizado bajo condiciones alcalinas nos permite la detección de sitios de rotura tanto de hebra sencilla como doble, sitios de reparación del ADN por escisión, etc. Además presenta una serie de ventajas sobre otros métodos de evaluación de daño al ADN entre las que se incluyen: la medición del daño en células individuales, el pequeño número de células necesario para llevar a cabo el ensayo [alrededor de 10000 células], o el poder realizarse para cualquier tipo de célula [Collins et al., 1996]. El ensayo cometa se ha empleado en una gran variedad de organismos acuáticos para el estudio de diferentes compuestos genotóxicos [Lee and Steinert, 2003]. Los estudios de genotoxicidad en larvas de *C. riparius* son numerosos, habiéndose 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 [Al-Shami et al., 2012; Gusev et al., 2010; Lee and Steinert, 2003; Morales et al., 2013; Nair et al., 2013]. Aunque los estudios de genotoxicidad con *P. acuta* no son tan numerosos como con *C. riparius*, sí existen estudios previos de genotoxicidad con esta especie tras exposición a Vz [Sánchez-Argüello et al., 2016, 2012].



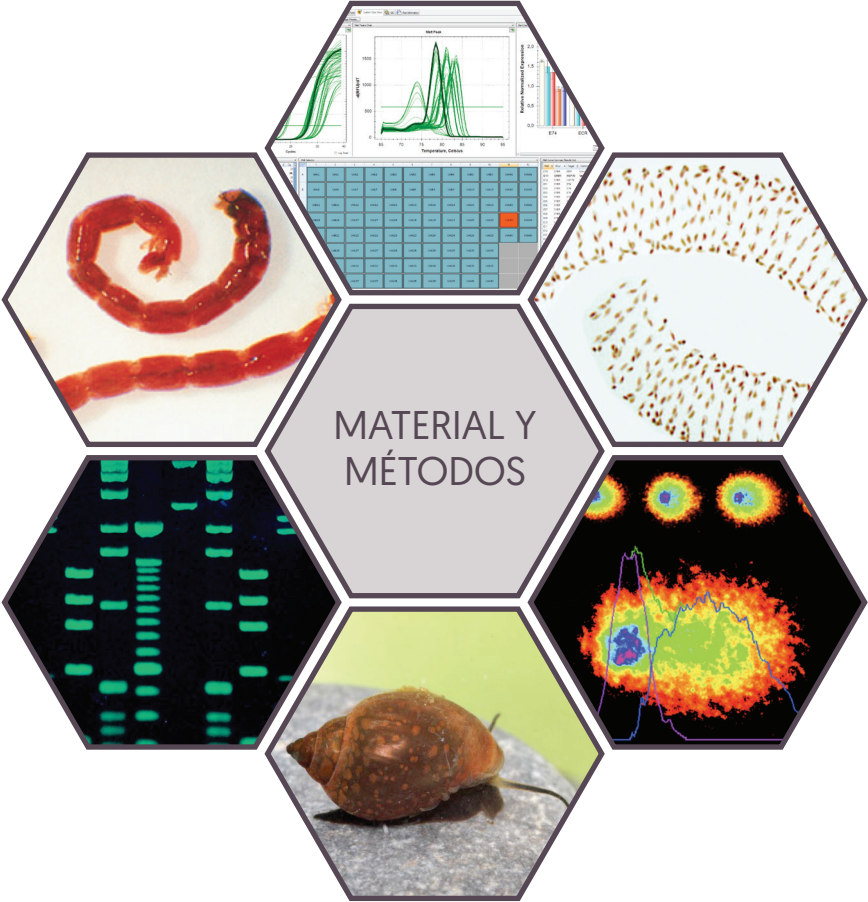
3. Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral es profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción de la Vinclozolina en organismos acuáticos. Los estudios realizados se han centrado en efectos a nivel molecular y celular, analizando su genotoxicidad y las alteraciones en la expresión en distintos genes, si bien estos se han complementado con estudios a otros niveles de organización biológica.

Se han seleccionado dos organismos modelo: *Chironomus riparius* y *Physa acuta*. El insecto acuático *C. riparius* es ampliamente utilizado en Ecotoxicología, para el que existen guías metodológicas estandarizadas, y ha sido objeto a su vez de numerosos estudios con biomarcadores. *P. acuta* es un gasterópodo acuático menos utilizado en estudios ecotoxicológicos y del que se dispone de escasa información sobre su idoneidad como especie centinela mediante el empleo de biomarcadores.

Los objetivos específicos que se pretenden alcanzar son:

1. Determinar la actividad de la Vinclozolina como disruptor endocrino en invertebrados, analizando la expresión génica de genes directamente implicados en rutas hormonales de ambas especies.
2. Evaluar las alteraciones inducidas por la Vinclozolina en la actividad transcripcional de genes relacionados con la respuesta a estrés celular y la capacidad detoxificadora en ambas especies.
3. Analizar la genotoxicidad de la Vinclozolina mediante el ensayo cometa y relacionarla con la alteración transcripcional de genes involucrados en mecanismos de reparación del ADN en ambas especies.
4. Estudiar comparativamente los efectos que produce la Vinclozolina en el desarrollo de *C. riparius* mediante el empleo de ensayos ecotoxicológicos con distintas fases de su ciclo de vida.



4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Especies de ensayo

4.1.1. *Chironomus riparius*

C. riparius es un díptero que desarrolla las tres primeras etapas de su ciclo de vida bajo condiciones acuáticas, principalmente asociadas a sedimento: huevo, larva [con tres mudas] y pupa. Tras una metamorfosis controlada hormonalmente, que permite un cambio drástico morfológico y fisiológico, los individuos se convierten en adultos [mosquitos]. Los quironómidos empleados en este trabajo proceden de cultivos establecidos, mantenidos durante numerosas generaciones en laboratorio de acuerdo con protocolos estándar para ensayos de toxicidad [OECD, 2011; USEPA, 2000a]. Estos cultivos se mantienen bajo condiciones de temperatura controlada de 20 ± 1 °C, aireación constante y un fotoperiodo de 16:8 horas de luz:oscuridad, pudiendo así estandarizarse los tiempos de crecimiento y desarrollo. En estas condiciones, el ciclo de vida de este invertebrado es de 22 a 25 días. Las masas de huevos se disponen en cubetas individuales. Una vez que las larvas emergen de ellas, crecen en el mismo medio de cultivo [ver apartado 4.3], alimentándose dos veces por semana con 0.5 mg/larva de comida comercial de peces TetraMin® [Tetra, Alemania] y 0.2 gramos/cubeta de hojas secas molidas de ortiga. Además, se añade papel de celulosa para simular el sedimento, permitiendo así la construcción de los tubos donde transcurren las distintas etapas larvares. Tras pasar por los cuatro estadios larvares, los individuos se transforman en pupas y posteriormente en adultos. Estos buscan aparearse al cabo de pocas horas, dado que no se alimentan y tan sólo sobreviven de tres a cinco días. Los mosquitos son recolectados regularmente de las distintas cubetas, poniéndose en común tanto machos como hembras para permitir los cruzamientos y la puesta de huevos.

4.1.2. *Physa acuta*

P. acuta es un gasterópodo hermafrodita de agua dulce, que se reproduce preferentemente por fecundación cruzada. Los gasterópodos de este trabajo proceden de cultivos establecidos del Laboratorio de Ecotoxicología del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria [INIA]. Su mantenimiento se lleva a cabo en una cámara con temperatura controlada de 19 ± 1 °C, aireación constante y un fotoperiodo de 16:8 horas de luz:oscuridad. Aunque no existen guías de ensayo estandarizadas para esta especie, sí las hay para otras especies de gasterópodos similares, como *Lymnaea stagnalis*, que comparte muchas características evolutivas con *P. acuta* [OECD, 2016c, 2016b]. El ciclo de vida de este invertebrado dura de 3 a 4 meses en condiciones de laboratorio, si bien su longevidad en laboratorio puede alcanzar el año. El cultivo se inicia con la recuperación de las masas de huevos y su subsiguiente cultivo en vasos de precipitado con aireación. Tras la eclosión, los juveniles se alimentan *ad libitum* con comida en polvo para

peces Sera Micron® [Sera, Alemania], la cual se va sustituyendo progresivamente por comida para adultos [TetraDiscus®], hasta alcanzar 1.2 mg/caracol. Una vez que estos han alcanzado el tamaño de adultos, son trasladados a vasos de dos litros que contienen medio de cultivo [ver apartado 4.3], permitiendo la puesta de huevos.

4.2. Vinclozolina

La Vinclozolina [Vz] [3-[3,5-diclorofenil]-5-etenil-5-metil-2,4-oxazolidinadiona] es un plaguicida usado con fines agrícolas en cultivos de frutas, verduras y plantas ornamentales. Puede alcanzar las aguas superficiales tras su aplicación mediante pulverización. La concentración máxima ambiental estimada es de 52 µg/L [Gazo et al., 2013], habiéndose detectado 0.5 µg/L en el caso de aguas superficiales [Ducrot et al., 2010]. Las principales características fisicoquímicas se muestran resumidas en la Tabla 1. En la actualidad, la Vz es uno de los 66 compuestos incluidos en el Anexo 15 del informe de la Dirección General de Medio Ambiente de la Comisión Europea para el establecimiento de una lista de sustancias prioritarias para una evaluación adicional de su papel en la alteración endocrina [EC, 2000]. Según este informe, la Vz cuenta con claras evidencias científicas de ser una sustancia disruptora endocrina, junto con la sospecha de ser una sustancia cancerígena, suscitando una alta preocupación debido a su elevado volumen de producción a nivel mundial. La sustancia se ha descrito como tóxica con efectos duraderos para la vida acuática y se sospecha que puede causar cáncer y reacciones alérgicas en la piel. Debido a su capacidad antiandrogénica, tanto en mamíferos como en peces, se encuentra recogida además por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos [EPA] en la lista de contaminantes candidatos para su evaluación por sus niveles en aguas potables [USEPA, 2016]. En este sentido, a causa de su amplio uso, resulta crucial evaluar los efectos tóxicos que puede causar en aguas superficiales [Yang et al., 2011].

Vinclozolina	
Nombre INCI	3-[3,5-dichlorophenyl]-5-methyl-5-vinylloxazolidine 2,4-dione
Sinónimos	Vinchlozoline, Vinclozalin, Vinclozoline, Ronilan (R), Vorlan
Abreviatura	Vz
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₉ Cl ₂ NO ₃
Número CAS	50471-44-8
Peso molecular	286.11
Pureza del producto comercial	≥ 99%
Densidad	1.51 g/cm ³
Solubilidad en agua	3.4 mg/L
Log Kow	3.0

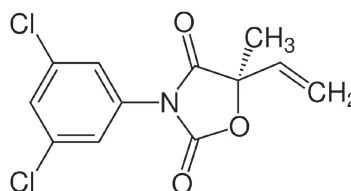


TABLA 1. Principales características físico-químicas de la Vinclozolina.
Fuentes: Sigma-Aldrich y Valsamaki et al. [2007].

4.3. Reactivos

Salvo que se especifique lo contrario, todos los productos químicos empleados son de PANREAC, Merck y Sigma-Aldrich.

- Agua reconstituida: 5.88 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 0.5 L agua destilada, 2.465 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 0.5 L agua destilada, 1.295 g de CO_3HNa en 0.5 L agua destilada y 0.115 g de ClK en 0.5 L agua destilada.
- Medio de cultivo *C. riparius*: CaCl_2 0.5 mM, NaCl 1mM, MgSO_4 1mM, NaHCO_3 0.1 mM, KH_2PO_4 0.025 mM.
- Medio de cultivo *P. acuta*: CaCl_2 2 mM, MgSO_4 0.5 mM, NaHCO_3 0.77 mM, KCl 0.08 mM.
- PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2HPO_4 10 mM.
- PBS-Tween 20: 0.1%: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2HPO_4 10 mM, Tween 20 0.1%.
- 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 para el ensayo cometa: Tris-HCl 10 mM, EDTA 100 mM, NaCl 2.5 M, DMSO 10 %, Tritón X-100 10% pH 10.
- Tampón de lisis [extracción ARN polisomal]: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1% Triton-X100, 1% desoxicolato de sodio, 0.4 U/mL SUPERase-In™ RNase Inhibitor [Thermo Scientific, EE.UU.], 1 mM DTT, 0.2 mg/mL cicloheximida, 5 U/mL DNase I.
- Tampón TAE: Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM.
- Tampón TE: Tris 40 mM, EDTA 1 mM pH 7.8.
- Tampón TES: NaCl 100 mM, Tris 10 mM, EDTA 2.5 mM, SDS 1%.

4.4. Oligonucleótidos de *Chironomus riparius*

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en los análisis de expresión génica con *C. riparius* se obtuvieron a partir de trabajos publicados previamente: Actina [Martínez-Guitarte et al., 2007]; GAPDH [Park et al., 2009]; EcR [Nair and Choi, 2011]; GSTD3 [Nair et al., 2011]; Hsp70 [Morales et al., 2013]; Hsp24 [Martín-Folgar et al., 2015]; Cyp18a1, Cyp4g, Dib, E74, FOXO, Gp93, Krh-1, MAPR [Aquilino et al., 2016]; ATM, DECAF, NLK, XRCC1 [Aquilino et al., 2018].

Gen	Directo (F)	Inverso (R)	Eficiencia
<i>Actina</i>	GATGAAGATCCTCACCGAACG	CGGAAACGTTTCATTACCG	104.0
<i>ATM</i>	AAGTGCTACTTTATGATCCAATGT	TGTACACAATTTAATGCACGA	97.3
<i>Cyp18a1</i>	GTTTCACTCGAGACGATCCA	TTTAGCGGCTTGAAATGTTG	104.5
<i>Actina</i>	GATGAAGATCCTCACCGAACG	CGGAAACGTTTCATTACCG	104.0
<i>ATM</i>	AAGTGCTACTTTATGATCCAATGT	TGTACACAATTTAATGCACGA	97.3
<i>Cyp18a1</i>	GTTTCACTCGAGACGATCCA	TTTAGCGGCTTGAAATGTTG	104.5
<i>Cyp4G</i>	TAAGTGGAAGTGGTGGGTACAT	TTGCATTGTGCATTTAGGATGTC	99.5
<i>DECAY</i>	AAAGTGTTCCGATTATGGC	TTCACACCAGTTAAAATCCAC	104.3
<i>DIS</i>	GAGGCATCCATACAACCTTCATTC	CAAAATCCTTCCAACCTCCAATAG	98.4
<i>EcR</i>	TCTTCTCACGGCCATCGTCA	GCTGCATCTTGTTCGCCAC	107.1
<i>E74</i>	TCTTACTGAAACTTCTCAAG	GCTTTGAGACAGCTTTGGAAT	105.4
<i>FOXO</i>	ATGGCGGTGATGTCCAACAA	TGAACCCACGAATTGCACGA	97.5
<i>GAPDH</i>	GGTATTTCAATGAATGATCACTTTG	TAATCCTTGGATTGCACGTACTTG	107.7
<i>GstD3</i>	TGGTTGAAACGAGAGCACCA	TCGGATATAGAGTGCCAGCATCG	110.5
<i>Gp93</i>	ACCCCATGTGTACTCGTTGC	CGTGGATTAAATTCGAGAGC	103.5
<i>Hsp24</i>	TCACTTAATGACTGGATATCG	GAATCCATCCTTGCCGAAATGC	100.0
<i>Hsp70</i>	ACTTGAACCAGTTGAGCGT	TTGCCACAGAAGAAATCTTG	102.8
<i>Kr-h1</i>	CCCTCGAGCTAACTCCACCC	GCTGCAATGTTGACTGGTT	103.9
<i>MAPR</i>	GGACCGTATGCAGCTTTTGG	TTGTTGCCAGGCCTTAACA	101.6
<i>NLK</i>	CATCTCACCAGATCGTCTCT	GAATTTATTTGATTATGCGGC	105.7
<i>XRCC-1</i>	GACGATTGCATTGGATAGT	ATCAACATATCGCCATCAG	100.9

TABLA 2. Oligonucleótidos empleados en *C. riparius* para la amplificación por RT-PCR de los genes de estudio. Para cada gen se indica el nombre, las secuencias 5'-3' de los cebadores directo [F] e inverso [R] utilizados y la eficiencia [%] de la amplificación.

4.5. Oligonucleótidos de *Physa acuta*

Para los análisis de expresión génica con *P. acuta*, algunas de las secuencias de los oligonucleótidos empleados se obtuvieron a partir de los siguientes trabajos previos: ER [Martínez-Paz et al., 2017]; Hsp90 [Morales et al., 2018]; CASP3, Cyp2U1, Cyp3A7, Cyp4f22, GAPDH, GstO2, GstT2, Hsp16, Hsp17, Hsp20.4, Mrp1 ABC, RAD-1, RpL10, RpL13, SOD-Cu [Aquilino et al., 2019]. Las secuencias restantes se encuentran sin publicar [ver Anexo I]: ATM, ATR, XPA-1, XRCC2, XRCC4.

Gen	Directo (F)	Inverso (R)	Eficiencia
<i>ATM</i>	AAATGTCTGGGCTCTGATGG	GCGGGTTGTTCTATCAAGT	107.7
<i>ATR</i>	TCTATGACCCTCTGGTGGAG	TTTCATCTGTGGCCTCCTTG	92.0
<i>CASP3</i>	GTCTGTAATTCTCACCCATG	AGTTCAGTGCCTCTGCAAGC	99.2
<i>Cyp2U1</i>	GTGCATCCTCTACGCGATCA	GGCTAGTTTGGCCTGTCTT	94.7

TABLA 3. Oligonucleótidos empleados en *P. acuta* para la amplificación por RT-PCR de los genes de estudio. Para cada gen se indica el nombre, las secuencias 5'-3' de los cebadores directo [F] e inverso [R] utilizados y la eficiencia [%] de la amplificación.

Gen	Directo (F)	Inverso (R)	Eficiencia
<i>Cyp3A7</i>	ACGGCTTGGCCTCTCAATAC	CGGTTTCTTTCTCGGCGTTC	90.0
<i>Cyp4F22</i>	AGCAGAAAAAGCTCAGCCCT	CTTGTTTTGGCAGCCAGTC	98.7
<i>ER</i>	CTATGCCAGGTGTGTAATGAC	CGAAGCCGACATGCTTGACA	102.3
<i>GAPDH</i>	ATACATCAGGAACAGGGACTC	GACTTATGACAACCGTGCA	94.9
<i>GstO2</i>	CCACCTGGCAACTTGGTTTG	GCTTGCCAGATGCGTAAGAC	94.0
<i>GstT2</i>	TCGATCTTCTATCGCAGCCG	TTCTGAGCGCAACAGGTTTG	90.7
<i>Hsp16</i>	GCATGAGGAGAAGCAAGACA	CAGTACACCATGGGCATTCA	88.1
<i>Hsp17</i>	GGGATCTAAGGACCCCGATG	GGCTGTAATGGCGAAGCTCC	101.0
<i>Hsp20.4</i>	AGCGAGATGTTACCCTCAA	GAGAGACAGCCGTTTGTTC	94.0
<i>Hsp90</i>	GTTTGTGTCTACTAAAGAAGGCC	TGCTACTAGCCTATTTGATACAA	100.4
<i>Mrp1 ABC</i>	CAGGGGCAGGTAAGTCATCC	AGTGAGCCTTGATCGCACAT	100.0
<i>RAD-1</i>	GTGTACAAGCCAACGCTTTC	ACTCCAGGGATTACACTGCT	93.9
<i>RpL10</i>	TGCACGTGAGGCTGATGAAA	GTGGCCACTTTGTGAAACCC	104.2
<i>rpL13</i>	ATGAGCTTAAGGCTGCAGG	CCAAGTTGGTCTTGTACTCTTTAG	107.2
<i>SOD-Cu</i>	AGAAAGCTGGTGCTGCAACTA	AGGATTAAGTGGCCTCCAGC	104.9
<i>XPA-1</i>	CACACAATCCAAAATGGGGAG	TGAGAGATCTTCCGCCACA	101.8
<i>XRCC-2</i>	CGTATTTGGGTAGGTCGTGG	CAAACACAAAACGCCTTCCA	101.2
<i>XRCC-4</i>	AAAGGGATGAAACACCTCCAG	TTGTGTTATTGCTCGACTCT	96.2

TABLA 3. Oligonucleótidos empleados en *P. acuta* para la amplificación por RT-PCR de los genes de estudio. Para cada gen se indica el nombre, las secuencias 5'-3' de los cebadores directo [F] e inverso [R] utilizados y la eficiencia [%] de la amplificación.

4.6. Tratamientos experimentales

La toxicidad de la Vz se evaluó bajo diferentes tiempos de exposición y empleando distintas fases del ciclo de vida de las especies estudiadas. Para *C. riparius* se utilizaron larvas de cuarto estadio y embriones, mientras que en el caso de *P. acuta* los estudios se llevaron a cabo únicamente en adultos. Todos los experimentos se realizaron bajo las mismas condiciones de laboratorio, según se detalla en los apartados 4.1.1 y 4.1.2. La vida media de la Vz es de 10.8 horas [Sánchez-Argüello et al., 2012], por lo que su concentración en el medio de ensayo tiende a disminuir en el tiempo. Para solventar este inconveniente, las concentraciones nominales ensayadas se mantuvieron constantes durante los experimentos mediante la renovación completa diaria del medio de ensayo, o bien añadiendo diariamente a dicho medio un pequeño volumen del compuesto hasta alcanzar la concentración nominal deseada. Dada la baja solubilidad de la Vz en agua, en todos los casos se utilizó acetona como solvente, siempre a una concentración final del 0.1% [v/v].

Teniendo en cuenta la información previa disponible y las diferencias en la sensibilidad de las especies y estadios empleados, se estudió un rango de concentraciones de Vz variable en función de la especie, el estadio del ciclo de vida, el parámetro estudiado y la duración de la exposición. Las concentraciones de estudio de la Vz fueron: 20, 200 y 2000 µg/L para larvas de cuarto estadio de

C. riparius; 2, 20 y 200 µg/L para embriones de *C. riparius*; y 20, 200, 500 y 5000 µg/L para adultos de *P. acuta*. En todos los casos, paralelamente a las concentraciones del tóxico estudiadas, se contó con los controles necesarios para la valoración de sus efectos.

4.6.1. Ensayos de exposición aguda con larvas de *Chironomus riparius*

Los experimentos se llevaron a cabo utilizando larvas de cuarto estadio o última muda [son larvas de mayor tamaño y se encuentran en la fase previa a la metamorfosis]. Esta fase larvaria se determina en función del tamaño de la cápsula cefálica [USEPA, 2000b].

4.6.1.1. Análisis de la supervivencia

Los efectos letales en *C. riparius* se estudiaron exponiendo larvas de cuarto estadio durante 96 horas a un gradiente de concentraciones de Vz [20, 200 y 2000 µg/L] y haciendo un recuento del número de larvas vivas cada 24 horas, coincidiendo con el cambio de medio. Se realizaron tres experimentos independientes con 50 individuos para cada concentración estudiada, en un volumen final de 50 mL de medio de cultivo.

4.6.1.2. Análisis de los niveles de expresión génica

Para los estudios de expresión génica se emplearon tres larvas individuales por réplica [n=9], exponiéndolas durante 24 o 48 horas a las concentraciones de 20 y 200 µg/L. Transcurridos estos tiempos, las larvas se mantuvieron almacenadas a -80 °C hasta la posterior extracción de ARN [ver apartado 4.7.]. Tras la retrotranscripción, proceso por el cual es posible obtener ADN complementario [ADNc] a partir del ARN mensajero [ARNm] para el que codifica [ver apartado 4.7.3], se llevaron a cabo los análisis de la actividad transcripcional de los genes de estudio [ver apartado 4.7.4].

4.6.1.3. Análisis de la genotoxicidad [ensayo cometa]

Finalmente, se estudiaron los efectos genotóxicos de la Vz empleando las suspensiones celulares obtenidas a partir de grupos de 13 individuos expuestos durante 24 horas a las concentraciones de 20 y 200 µg/L. Todo el procesamiento necesario para llevar a cabo el ensayo cometa se realizó según lo descrito en el apartado 4.7.5.1.

4.6.2. Ensayos de reproducción con *Chironomus riparius*

El ensayo se llevó a cabo con larvas del segundo estadio [larvas que han experimentado una sola muda y han pasado de ser fitoplanctónicas a vivir enterradas en sedimento] y siguiendo las recomendaciones de la OECD [2010]. Los sistemas agua-sedimento se prepararon en vasos de precipitado de vidrio de 2 L, con

300 gramos de sedimento y manteniendo una proporción 1:4 de sedimento:agua reconstituida. El sedimento se preparó con arena industrial (esterilizada durante 24h a 220 °C) cribada con un tamiz con un tamaño de poro 2 mm y posteriormente de 0.7 mm, a la que se le añadió un 6.5% de arcilla blanca o kaolina [BIOCOP Productos Biológicos, S.A., España] y un 2.7% de turba obtenida de vivero. Los sistemas agua-sedimento se dejaron estabilizar durante 3 días con aireación suave, tras lo cual se agregaron las larvas [25] con la ayuda de una pipeta Pasteur. Durante un lapso de 2 horas se permitió que estas migraran al sedimento, añadiendo posteriormente al agua superficial el solvente [acetona] o la Vz a las concentraciones de 2, 20, 200 y 2000 µg/L.

Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado y renovados semanalmente, para lo cual se procedió a retirar toda el agua superficial con la ayuda de una bomba de vacío para líquidos [DINKO, España], para a continuación añadir el agua reconstituida con Vz recién preparada. Con este procedimiento se consiguió mantener estable el sedimento. Las larvas fueron alimentadas una vez por semana con 1 mg/larva de TetraMin®. La duración del experimento fue de 21 días. El número, sexo de los adultos emergidos y número de masas de huevos depositadas fueron monitorizados desde la primera emergencia [a los once días]. Los huevos fueron utilizados para un subsecuente ensayo de embriotoxicidad [ver apartado 4.6.3].

Los parámetros analizados fueron:

- **Ratio de emergencia.** Número de larvas introducidas que llega a la fase adulta en una condición experimental concreta.

$$RE = \frac{n_e}{n_a}$$

Donde:

RE = ratio de emergencia

n_e = número de mosquitos vivos que han emergido por sistema agua-sedimento

n_a = número de larvas introducidas por sistema agua-sedimento

- **Fecundidad.** Número de puestas dividido por el número de hembras en cada sistema agua-sedimento.

- **Tasa de desarrollo.** Proporción de desarrollo larvario que tiene lugar en un día, cuya magnitud es 1/día.

Donde:

$$x = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e} \quad x_i = 1 / \left(\text{día}_i - \frac{1_i}{2} \right)$$

x = media por sistema agua-sedimento

i = índice de intervalo de inspección

m = número máximo de inspección por intervalos

f_i = número de mosquitos que han emergido en el intervalo i

n_e = número total de mosquitos emergidos al final del experimento

x_i = tasa de desarrollo de los mosquitos emergidos en el intervalo i

4.6.3. Ensayos de embriotoxicidad con *Chironomus riparius*

La exposición de los embriones a Vz se realizó sin separar los huevos del material gelatinoso que los envuelve en las puestas. Las masas de huevos se recolectaron tras la ovoposición y se dividieron en dos mitades iguales, empleando una de ellas como control y la otra para valorar los efectos del tóxico. Las exposiciones tuvieron lugar de manera individual en placas de 6 pocillos Falcon® [VWR, España] con 5 mL de medio de cultivo por pocillo, manteniendo las condiciones de temperatura y fotoperiodo anteriormente mencionadas y renovando el medio cada 24 horas.

4.6.3.1. Análisis de la tasa de eclosión

El efecto de la Vz sobre la eclosión se estudió tras la exposición a 2, 20, 200 y 2000 µg/L de embriones procedentes tanto de parentales expuestos como no expuestos, desde la fase de blastodermo [aproximadamente 24 horas postovoposición] hasta la eclosión de las larvas, aproximadamente a las 72 horas [ver Figura 10]. El porcentaje de eclosión se calculó por observación directa, contabilizando con la ayuda de un estereomicroscopio trinocular Nikon SMZ-2T [Nikon, Japón] el número de larvas eclosionadas con respecto al número total de huevos.

4.6.3.2. Análisis de los niveles de expresión génica

Los efectos de la Vz sobre la actividad transcripcional de los genes de estudio se analizaron en embriones expuestos durante 8 y 24 horas a 20 y 200 µg/L. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso para la extracción de ARN [ver apartado 4.7.1] y la subsiguiente retrotranscripción [ver apartado 4.7.3].

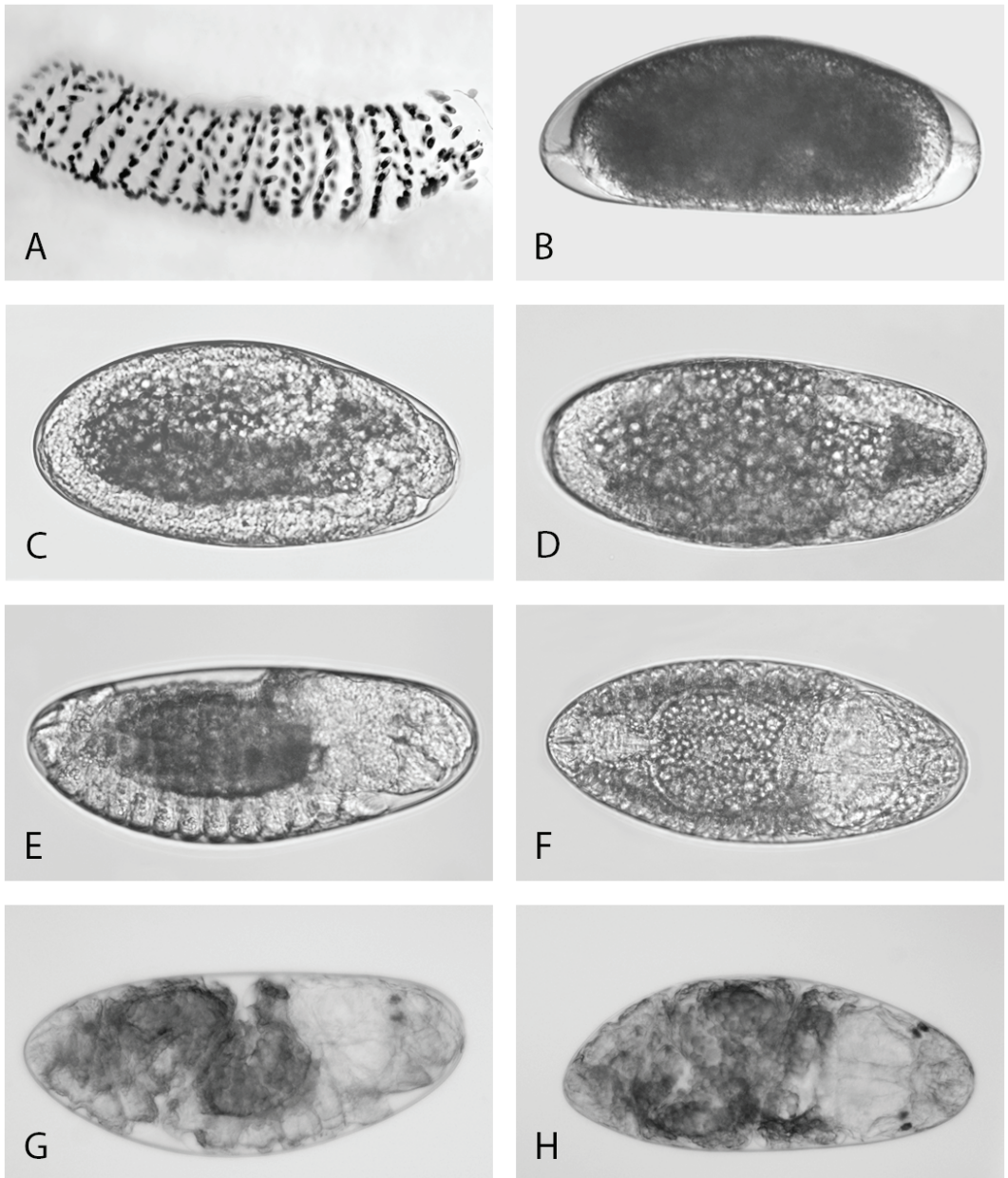


FIGURA 10. Imágenes de embriones de *C. riparius* obtenidas mediante microscopía de campo claro. [A] Aspecto general de una puesta completa; [B] Vista de un único huevo; [C y D] Estado del huevo 24 horas tras la recolección y al inicio de la exposición [vistas dorsal y ventral]; [E y F] Fase intermedia [vistas dorsal y ventral]; [G y H] Momento previo a la eclosión [vistas dorsal y ventral], aproximadamente 72 horas tras la recolección.

4.6.4. Ensayos de exposición aguda con *Physa acuta*

4.6.4.1. Análisis de la supervivencia

Los experimentos se llevaron a cabo con individuos de *P. acuta* sexualmente maduros [adultos]. Los efectos letales de la Vz se estudiaron tras exposiciones de 96 horas a un gradiente de concentraciones [20, 200, 500 y 5000 µg/L], haciendo recuentos del número de individuos vivos cada 24 horas. Se realizaron tres experimentos independientes, empleando 50 individuos por cada concentración estudiada, en un volumen de medio de cultivo de 50 mL.

4.6.4.2. Análisis de los niveles de expresión génica

Los efectos de la vinclozolina sobre la actividad transcripcional se evaluaron exponiendo tres adultos por réplica (n=9) a 20 y 200 µg/L durante 24 horas, tras lo cual se almacenaron a -80 °C hasta el momento de proceder a la extracción de su ARN [ver apartado 4.7.1].

4.6.4.3. Análisis de la genotoxicidad [ensayo cometa]

Se estudiaron los efectos genotóxicos de la Vz mediante el ensayo cometa, a partir de suspensiones celulares de 13 individuos expuestos durante 24 horas a 20 y 200 µg/L. El procedimiento experimental de este ensayo se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 4.7.5.1.

4.7. MÉTODOS MOLECULARES Y DE GENOTOXICIDAD

4.7.1. Extracción de ARN

La extracción de ARN total de las muestras se llevó a cabo utilizando el método descrito por Chomczynski y Sacchi [1987], mediante el kit comercial TRIzol® [Invitrogen, Alemania], consistente en una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Las muestras biológicas se homogenizaron en TRIzol® [500 µl en el caso de larvas de *C. riparius* y adultos de *P. acuta*; 300 µL en el caso de embriones de *C. riparius*], e inmediatamente después fueron congeladas en nieve carbónica. En el caso de las larvas y los adultos, las muestras se dejaron descongelar y se centrifugaron a 10000 g durante 15 minutos a 4 °C, para permitir así la precipitación de membranas celulares, polisacáridos, ADN de alto peso molecular y material extracelular [en este punto, el ARN permanece en la fase acuosa, junto con las proteínas y el ADN].

Nota: En las pruebas llevadas a cabo con embriones de *C. riparius*, con el objetivo de facilitar la extracción de ARN, se eliminó previamente el material gelatinoso que forma la masa de huevos. Se lavaron para ello las muestras en hipoclorito sódico al 0.2% en PBS, agitando con suavidad durante unos segundos, tras lo cual se llevaron a cabo varios lavados con PBS.

En el caso de los embriones, no fue necesaria esta primera centrifugación. Las muestras ya homogeneizadas se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. Se añadieron a las fases acuosas de los tubos 0.2 volúmenes de cloroformo, agitándolos para mezclar bien el contenido y dejándolos incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos. Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos a 4 °C, permitiendo así que las muestras se separasen en dos fases, una acuosa y otra orgánica. El ARN permaneció exclusivamente en la fase acuosa y, por tanto, se recuperó esta fase de todos los tubos y se llevó a cabo una precipitación en un volumen de isopropanol equivalente a la mitad del volumen de TRIzol® empleado en la extracción. Tras incubar las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente, los tubos se centrifugaron a 10000 g durante otros 10 minutos. Finalmente, para eliminar los restos de isopropanol, se realizó un lavado con un volumen de etanol al 75% y una posterior centrifugación a 10000 g durante 5 minutos. Para mejorar la preservación de las muestras, el ARN extraído se resuspendió en un volumen agua tratada con 0.1% de dietilpircarbonato (DEPC) [Sigma-Aldrich], dado que el DEPC es un inhibidor inespecífico de ARNasas.

Para una correcta retrotranscripción y la posterior cuantificación de los transcritos, las muestras de ARN tienen que estar libres de contaminación, como la que puede derivar de la presencia de sales, proteínas, solventes o ADN genómico. Por ello, para eliminar las posibles trazas de este ADN genómico, las muestras se incubaron con 1 µL de ADNasa I libre de ARNasas y 5 µL de tampón de reacción 10x [Roche], durante 90 minutos a 37 °C. Las enzimas se retiraron de las muestras por extracción orgánica con fenol-cloroformo, usando tubos *5Prime Phase Lock Gel Light* [Quantabio, EE.UU.] para optimizar la recuperación de la fase acuosa. Finalmente, el ARN se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 75%. El ARN purificado se resuspendió en agua DEPC y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Tanto la calidad como la cantidad del ARN obtenido se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en tampón tris-acetato-EDTA [TAE]. Los geles se tiñeron con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio [Sigma-Aldrich] y posteriormente se visualizaron con luz ultravioleta, empleando para ello el sistema de documentación de geles Chemigenius 3 [SynGene], equipado con el programa de adquisición de imágenes GeneSnap [SynGene, Reino Unido]. Para cuantificar la cantidad de ARN extraída de las muestras, se midió su absorbancia empleando un espectrofotómetro BioPhotometer® 6131 [Eppendorf]. Como indicadores de buena calidad de las muestras de ARN (libres de contaminación), se consideraron valores de densidad óptica DO 260/280 entre 1.80 y 2.00 y valores de DO 260/230 iguales o superiores a 1.80.

4.7.2. Extracción de ARN polisomal

Para la extracción del ARN polisomal, en primer lugar, se congelaron en tubos a -80 °C tanto larvas individuales de cuarto estadio de *C. riparius* como grupos de cinco individuos adultos de *P. acuta*. Tras la congelación, las muestras se pulverizaron mediante el uso de un mortero previamente enfriado, seguido lo cual se recogió el

material pulverizado y se homogeneizó pipeteando vigorosamente en 0.8 mL de tampón de lisis. Tras una centrifugación a 13200 g durante 1 min a 4 °C, se eliminaron los restos celulares y se recuperó el sobrenadante. Una nueva centrifugación de éste durante 5 minutos a 13200 g y 4 °C permitió eliminar los núcleos. Una vez más, se recuperó el sobrenadante de las muestras y se mantuvo esta vez a 4 °C durante 30 minutos, para poder eliminar por precipitación cualquier contaminación de ADN genómico. El lisado resultante tras la acción del tampón se añadió directamente sobre un gradiente de sacarosa al 15-40% [peso/volumen]. El gradiente se generó añadiendo en primer lugar 8 mL de sacarosa al 40%, con precaución de no generar burbujas que pudiesen romper el gradiente. A continuación se añadieron 2 mL de sacarosa al 15%, teniendo cuidado para no destruir la interfase generada entre ambos gradientes. Por último, se agregó a la parte superior de cada gradiente 1 mL del extracto celular anteriormente obtenido. Se cubrió cada tubo con Parafilm® [Sigma-Aldrich] y se ultracentrifugaron todos a 18000 g durante 100 minutos a 4 °C en un rotor SW 41 Ti [Beckman Coulter, EE.UU.]. Posteriormente, mediante monitoreo continuo, se recolectó 1 mL de 13 fracciones a 254 nm con un detector ISCO UA-6 UV [Teledyne Technologies, EE.UU.]. El ARN de las distintas fracciones de sacarosa [polisomales y subpolisomales] se extrajo mediante fenol-cloroformo [para eliminar las proteínas] y se precipitó posteriormente con isopropanol, tras su tratamiento con proteinasa K [100 µg/mL] durante 75 minutos a 37 °C. Tanto la calidad como la cantidad del ARN obtenido se midieron, respectivamente, por electroforesis en gel de agarosa y mediante el uso de un NanoDrop™ 1000 [Thermo Scientific].

4.7.3. Retrotranscripción

La retrotranscripción de ARNm a ADNc se realizó en todos los casos con la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney [M-MLV RT] [Invitrogen]. Esta enzima es una ADN polimerasa ARN dependiente que permite la síntesis de ADNc a partir de ARN mensajeros largos. En un primer paso, para cada condición experimental, se incubó durante 5 minutos a 65 °C una mezcla de 0.5 µg de ARN con 1 µL de oligo [dT], 1 µL 10 mM de dNTP [Biotools] y agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 12 µL, manteniendo posteriormente las muestras en hielo. En un volumen final de 20 µL se añadieron 4 µL 5x *First-Strand Buffer*, 2 µL DTT 10 mM, 1 µL RNaseOUT™ *Recombinant Ribonuclease Inhibitor* [40 unidades/µL] [Invitrogen] y 1 µL de la retrotranscriptasa M-MLV RT, incubando las muestras a 37 °C durante 50 minutos. Finalmente, la mezcla se incubó durante 15 minutos a 65 °C para inactivar la reacción.

4.7.4. Análisis de los niveles de expresión génica

La amplificación del ADNc para el estudio de los niveles de expresión de los genes seleccionados en este trabajo se realizó por PCR cuantitativa [RT-PCR] o PCR en tiempo real, una variante de la reacción en cadena de la polimerasa utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico. En conjunto, combinando estos dos pasos necesarios

de 1) retrotranscripción y 2) amplificación, podemos decir que para los análisis de expresión en este trabajo se ha empleado la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa.

4.7.4.1. Obtención e identificación de secuencias y diseño de oligonucleótidos

Los genes utilizados en este trabajo han sido caracterizados y diseñados en el laboratorio de Biología y Toxicología Ambiental de la UNED. Los oligonucleótidos se han diseñado específicamente, algunos por primera vez para este trabajo, ya que no estaban previamente descritos para estas especies. En los epígrafes 4.4 y 4.5 se detallan las secuencias de los oligonucleótidos empleados en las amplificaciones de ADN, así como las referencias bibliográficas de aquellas secuencias ya publicadas.

En el caso de *C. riparius*, los genes de estudio se obtuvieron a partir de un archivo que incluye todas las secuencias ensambladas del proyecto SRX147945 [Marinković et al., 2012] de la base de datos *Transcriptome Shotgun Assembly Sequence Database* [TSA], realizado con una mezcla de individuos de diferentes etapas del desarrollo. Este archivo se descargó y se usó para comparar en la base de datos *GenBank* con aquellas secuencias de interés, mediante el uso de la herramienta *Blast2GO* [Conesa et al., 2005]. Posteriormente, la búsqueda en la base de datos *Blast* confirmó la identidad de las proteínas obtenidas. En relación a la identificación de secuencias de *P. acuta*, la obtención de los genes de estudio se llevó a cabo de manera similar, pero empleando el transcriptoma publicado por Aquilino et al. [2019] y las secuencias procedentes de Romiguiet et al. [2014].

Con el fin de poder amplificar un fragmento concreto de cada gen de estudio, para los análisis por RT-PCR se diseñaron parejas específicas de oligonucleótidos (cebadores o *primers*) de acuerdo con los siguientes criterios:

- proximidad de las secuencias al extremo 3' del ARNm
- temperatura de anillamiento cercana a los 58 °C [para poder amplificar simultáneamente todos los genes a estudiar]
- tamaño del producto de PCR de entre 100 y 200 pares de bases [pb]

4.7.4.2. Cálculo de las eficiencias de amplificación de los oligonucleótidos

La eficiencia de cada pareja de *primers* se calculó a partir de la pendiente de la curva estándar de diluciones seriadas de muestras diluidas cinco veces 1:2 ($R^2 > 0.98$). En este caso, las condiciones de amplificación fueron las mismas que las empleadas posteriormente en los análisis de las alteraciones transcripcionales causadas por la Vz. Las eficiencias calculadas de esta forma se detallan en la Tabla 2 [en el caso de *C. riparius*] y en la Tabla 3 [en el caso de *P. acuta*].

4.7.4.3. Amplificación de los genes de estudio

Del mismo modo que en el caso de la PCR convencional, en la técnica de RT-PCR se emplean un molde de ADN, una pareja de *primers* específicos para cada gen de estudio, una mezcla de dNTP, tampón de reacción y una ADN polimerasa termoestable. A esto se incorpora también un fluoróforo, que permite la cuantificación precisa del número de copias del transcrito en las muestras. En la evaluación por RT-PCR de los efectos de la Vz se empleó el fluoróforo EvaGreen® (Biotium, EE.UU.), una molécula intercalante del ADN capaz de emitir fluorescencia al unirse a éste, con un espectro de excitación/emisión en torno a los 480/530 nm. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos [Bio-Rad] y para la cuantificación se empleó un módulo de lectura CFX96™ *Real-Time PCR Detection System* [Bio-Rad] acoplado a un termociclador C1000™ *Thermal Cycler* [Bio-Rad]. Gracias a que este equipo cuenta con sensores capaces de medir la fluorescencia emitida por el fluoróforo al finalizar cada ciclo de amplificación, se puede calcular la tasa de generación del producto específico a lo largo de los ciclos de la PCR [Heid et al., 1996].

Las reacciones de RT-PCR se realizaron en un volumen final de 20 µL y para cada gen de estudio estaban compuestas por una pareja de oligonucleótidos directo [*forward*] e inverso [*reverse*] en una concentración final de 300 nM cada uno, 25 ng de ADNc y *Quantimix Easy Probes kit* [Biotools] con 1 µL de 0.5X EvaGreen®. El protocolo para la amplificación de los distintos genes fue el siguiente: una primera desnaturalización de 30" a 95 °C, seguida de 39 ciclos que incluyeron desnaturalización a 95 °C durante 5", anillamiento a 58 °C durante 15" y elongación a 65 °C durante 10". En todos los casos, con el objetivo de confirmar que solo se amplificó un único producto de PCR, al final del programa se realizó una curva de desnaturalización, consistente en una lectura continua de la fluorescencia desde los 65 a los 95 °C en incrementos de 0.5 °C. Todas las condiciones experimentales ensayadas en cada placa llevaron en la misma la correspondiente réplica técnica, para descartar posibles errores debidos al pipeteo o la manipulación de las muestras. Asimismo, se realizaron triplicados de todas las placas empleadas en los experimentos, tomando la media de cada terna como resultado final.

4.7.5. Ensayo cometa

El ensayo cometa, o electroforesis en gel de una única célula, fue desarrollado en 1988 por Singh y colaboradores. Se trata de una técnica empleada para la detección de roturas de hebra sencilla y de doble hebra en el ADN, una herramienta muy útil para detectar el efecto genotóxico inducido sobre las células por agentes químicos, físicos o biológicos.

4.7.5.1. Procedimiento experimental

Todo el protocolo del ensayo cometa se realizó en oscuridad, para evitar el posible daño genotóxico que la incidencia directa de la luz puede producir en la molécula de ADN lábil. Para todas las condiciones experimentales analizadas, tanto en las larvas de *C. riparius* como en los adultos de *P. acuta*, las suspensiones

celulares necesarias para este ensayo se obtuvieron a partir de trece individuos que fueron cortados con un bisturí y homogeneizados con la ayuda de un cedazo. En el caso de los moluscos, resultó necesario quitar la concha previamente. Los homogeneizados se resuspendieron en tubos con 3 mL de PBS y se centrifugaron a 1500 g durante 5 minutos a 4 °C. Tras esto, se descartó el sobrenadante de los tubos y las células depositadas en el pellet se resuspendieron en 250 µL de PBS. Para determinar la viabilidad y el número de células de esta suspensión, se llevó a cabo una tinción por el método de exclusión, empleando para ello el colorante azoico azul tripán [Sigma-Aldrich].

Para realizar la electroforesis, para cada tubo se mezclaron 10 µL de la suspensión celular con 100 µL de agarosa de bajo punto de fusión [Sigma-Aldrich] al 1% atemperada a 37 °C. Se emplearon a continuación portaobjetos comerciales, específicamente preparados para el ensayo cometa [Cell Biolabs, EE.UU.], cada uno de los cuales contaba con tres posiciones para poder depositar las muestras de células. De esta forma, cada portaobjetos utilizado llevaba dos muestras de individuos procedentes de tratamientos con Vz y una muestra con células de individuos del correspondiente control. En cada una de las tres posiciones del portaobjetos se añadieron 75 µL de la mezcla de células y agarosa y se dejó que gelificaran durante 1 hora a 4 °C. Tras esto, las membranas de las células embebidas en la agarosa se lisaron con un tampón de lisis durante una hora a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se eliminó el tampón de lisis y el portaobjetos se incubó con un tampón alcalino durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, se prepararon los portaobjetos para la electroforesis, depositándolos con cuidado dentro de una cubeta horizontal y cubriéndolos con el tampón de electroforesis. La electroforesis corrió durante 25 minutos a 13 voltios y 300 mA. Este voltaje se determinó a razón de 1 voltio/centímetro de distancia entre los polos de la cubeta de electroforesis, mientras que el amperaje se ajustó con el tampón de electroforesis. Una vez finalizada, 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.

Para su posterior observación al microscopio, las muestras se tiñeron con 100 µL de VistaGreen [Cell Biolabs], durante 10 minutos y en oscuridad. A continuación, se deshidrataron a 45 °C y se añadió una gota del medio de montaje ProLong™ *Gold Antifade Reagent* [Invitrogen], con la finalidad de evitar la pérdida de fluorescencia debida a la destrucción fotoquímica del fluoróforo [*photobleaching*] y preservar durante meses la viabilidad de las muestras. Una vez endurecido el medio de montaje, las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot Photomicroscope [Zeiss, Alemania] equipado con un sistema de epifluorescencia y una cámara CCD Photometrics® CoolSNAP™ [Photometrics, EE.UU.]. Para la captura de imágenes se empleó la aplicación RS Image [Roper Scientific, EE.UU.].

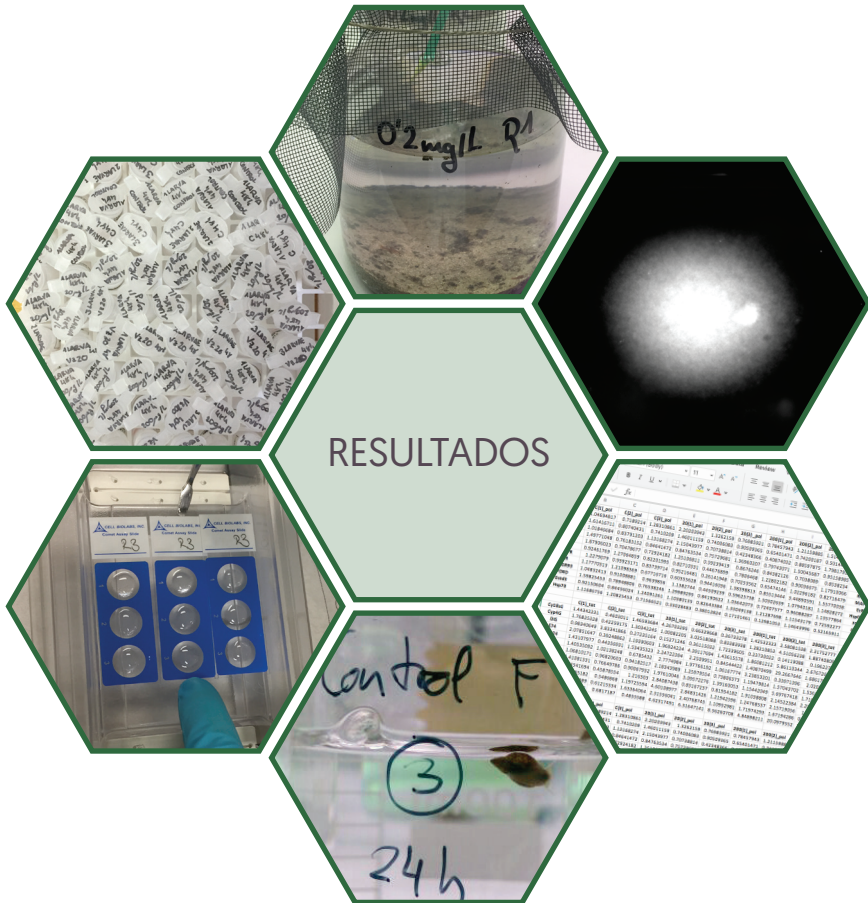
4.7.5.2. Cuantificación

Para la cuantificación de los cometas se fotografiaron un mínimo de 50 células por cada muestra analizada. Así, teniendo en cuenta que todas las condiciones experimentales se valoraron por triplicado, de cada una de ellas se contó finalmente con un mínimo de 150 células para la evaluación del efecto genotóxico de la Vz. Este efecto se valoró mediante la aplicación Comet Score™ [Tritek Corp., EE.UU.], que permite calcular para cada célula fotografiada los siguientes parámetros: *comet length*, *comet height*, *comet area*, *comet intensity*, *comet mean intensity*, *head diameter*, *head area*, *head intensity*, *head mean intensity*, *% DNA in head*, *tail length*, *tail area*, *tail intensity*, *tail mean intensity*, *% DNA in tail*, *tail moment* y *olive moment*. Según las recomendaciones encontradas en la literatura [Liao et al., 2009], los parámetros elegidos en el presente estudio fueron:

- la longitud de la cola, que nos muestra la distancia de la migración del ADN desde la cabeza del cometa hasta el extremo de la cola
- el momento cola, que relaciona el daño total con el fragmento más pequeño
- el momento oliva, que nos da información sobre el daño total al ADN con respecto al tamaño medio de los fragmentos
- el porcentaje de ADN en la cola, que muestra el daño total producido, habiéndose demostrado con diferentes compuestos que este parámetro responde proporcionalmente a los efectos producidos

4.7.6. Análisis de datos

Para cada uno de los parámetros ecotoxicológicos analizados, el estudio estadístico de los datos para valorar las posibles diferencias significativas entre las muestras de los tratamientos con Vz y sus respectivos controles se realizó a partir de tres experimentos independientes, cada uno de los cuales contó con tres réplicas biológicas. En el caso de los estudios transcripcionales, los niveles de expresión de los ARNm de cada muestra se normalizaron frente a los genes de referencia: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) y actina para *C. riparius*; proteínas ribosómicas L10 y L13 [*rpl10*, *rpl13*] y *GAPDH* para *P. acuta*. En el estudio de los diferentes parámetros analizados mediante el ensayo cometa, los valores de genotoxicidad se normalizaron con respecto a los respectivos controles. Los análisis estadísticos se realizaron empleando la versión 22 del programa informático IBM® SPSS Statistics® [IBM, EE.UU.]. Tras una primera comprobación de la normalidad y la homocedasticidad de los datos, se utilizaron las pruebas estadísticas apropiados para cada tipo de muestra: ANOVA en el caso de normalidad, o U de Mann-Whitney o Kruskal Wallis si los datos no eran normales. Posteriormente, se emplearon los test *posthoc* de Bonferroni o de Games Howell, dependiendo de si las varianzas eran homogéneas o no. En todos los casos las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con un p-valor menor a 0.05.



5. RESULTADOS

5.1. Exposiciones agudas de Vinclozolina en larvas de *Chironomus riparius*

5.1.1. Efectos en la supervivencia

Con el objetivo de analizar los efectos subletales de la Vz y escoger un rango de concentraciones que no afectase a la supervivencia para los ensayos posteriores, se expusieron larvas de cuarto estadio larvario de *C. riparius* a distintas concentraciones del compuesto. Para ello, se seleccionó el rango de concentraciones de 20, 200 y 2000 $\mu\text{g/L}$ y se analizó la supervivencia en intervalos de 24 horas hasta un total de 96 horas. La elección del rango de concentraciones se hizo teniendo en cuenta estudios previos en otros organismos, así como estudios *in vitro* sobre cultivos celulares [Ducrot et al., 2010; Lemos et al., 2010; Sánchez-Argüello et al., 2012; Tillmann et al., 2001; Vandeghehuchte et al., 2010], En la Figura 11 puede observarse que ninguna de las concentraciones de Vz ensayadas muestra efecto sobre la supervivencia de las larvas, observándose una supervivencia cercana al 100% en todos los tratamientos. Por tanto a partir de estos resultados, se puede concluir que la Vz a los tiempos y a las concentraciones estudiadas no afecta a la supervivencia de las larvas.

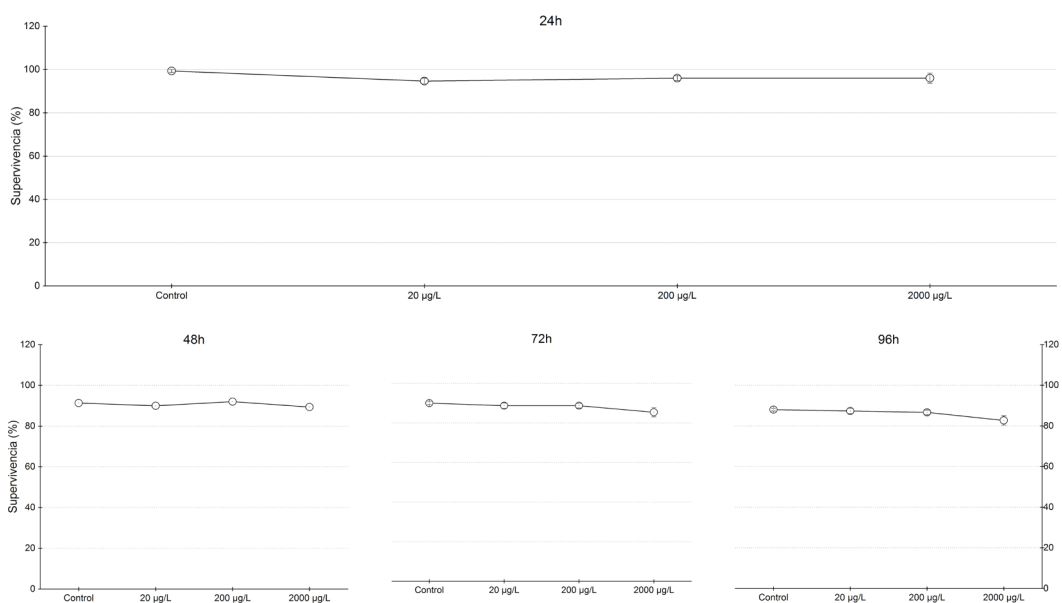


FIGURA 11. Curvas de supervivencia de larvas de cuarto estadio de *C. riparius*. Efecto de las concentraciones 20, 200 y 2000 $\mu\text{g/L}$ a distintos tiempos de exposición. Los valores representan la media y el error estándar [SE] de tres experimentos independientes [n = 150].

5.1.2. Efectos en la expresión génica

Para el análisis de los cambios producidos en la expresión de los distintos marcadores moleculares se empleó la RT-PCR, que permite determinar con un alto grado de sensibilidad posibles variaciones en los niveles de ARNm de los genes seleccionados para el estudio. Estos se relacionan con importantes procesos biológicos, como son:

- La ruta de respuesta a la ecdisona, una hormona involucrada en la regulación del desarrollo y en la supervivencia de los insectos.
- La respuesta a estrés celular y el metabolismo celular, incluyendo genes implicados en el mantenimiento de la homeostasis y en la supervivencia celular.

El análisis de la expresión se realizó exponiendo larvas del cuarto estadio de *C. riparius* durante 24 y 48 horas a dos concentraciones de Vz que no producían letalidad: 20 y 200 µg/L.

5.1.2.1. Efectos sobre la expresión de genes relacionados con el sistema endocrino

La regulación endocrina implica la interacción entre diferentes vías de respuesta a hormonas que regulan la homeostasis y el desarrollo del individuo. Para evaluar la capacidad como disruptor endocrino de la Vz, se analizaron genes implicados en la vía de respuesta a ecdisona [*EcR*, *E74*, *Kr-h1*], el metabolismo de la ecdisona [*DIS*, *Cyp18A1*] y la ruta de respuesta a la insulina [*FOXO*] [Forheadbox O]. Además, se seleccionó el receptor huérfano *MAPR* [Membrane associated progesterone receptor]. Este receptor presenta un dominio similar al de unión no covalente al grupo hemo relacionado con el citocromo b5, que se sabe que es un elemento funcional que interacciona con el sistema monooxigenasa microsomal citocromo P450 [Kimura et al., 2012; Ryu et al., 2017].

La ecdisona es una hormona vital para el desarrollo y la supervivencia de los insectos [ver apartado 2.4.1], puesto que regula los procesos de la muda y la metamorfosis. Por tanto, cambios en el patrón de expresión del gen del receptor de la ecdisona [*EcR*] podrían relacionarse con alteraciones en la ruta de dicha hormona. Los resultados obtenidos (Figura 12A) muestran cómo la concentración más baja evaluada [20 µg/L] aumenta los niveles de ARNm de *EcR*, que duplican los del control. Posteriormente, a las 48h de exposición, se recuperan niveles similares a los observados en el control. En el caso de la máxima concentración ensayada [200 µg/L] no se detectaron cambios significativos a ningún tiempo ensayado.

La activación del *EcR* inicia un proceso en cascada que lleva a la activación de otros genes que codifican para factores de transcripción. Entre ellos se encuentran los genes *E74* y *Kr-h1*. El primero [*E74*] se relaciona con la respuesta temprana en la ruta de la ecdisona, mientras que el segundo [*Kr-h1*] se considera que participa en la respuesta tardía. Al analizar su actividad transcripcional, no se detectaron cambios a las 24 h en ninguna de las concentraciones evaluadas. Sin embargo, sí se observó un aumento de los niveles de ARNm en ambos genes a las 48 h con 20 µg/L

[Figura 12B, 12C]. Esto concuerda con el hecho de que una vez activado el gen *E74*, actúa como factor de transcripción, produciendo cambios en genes de respuesta tardía como es el caso de *Krh-1*.

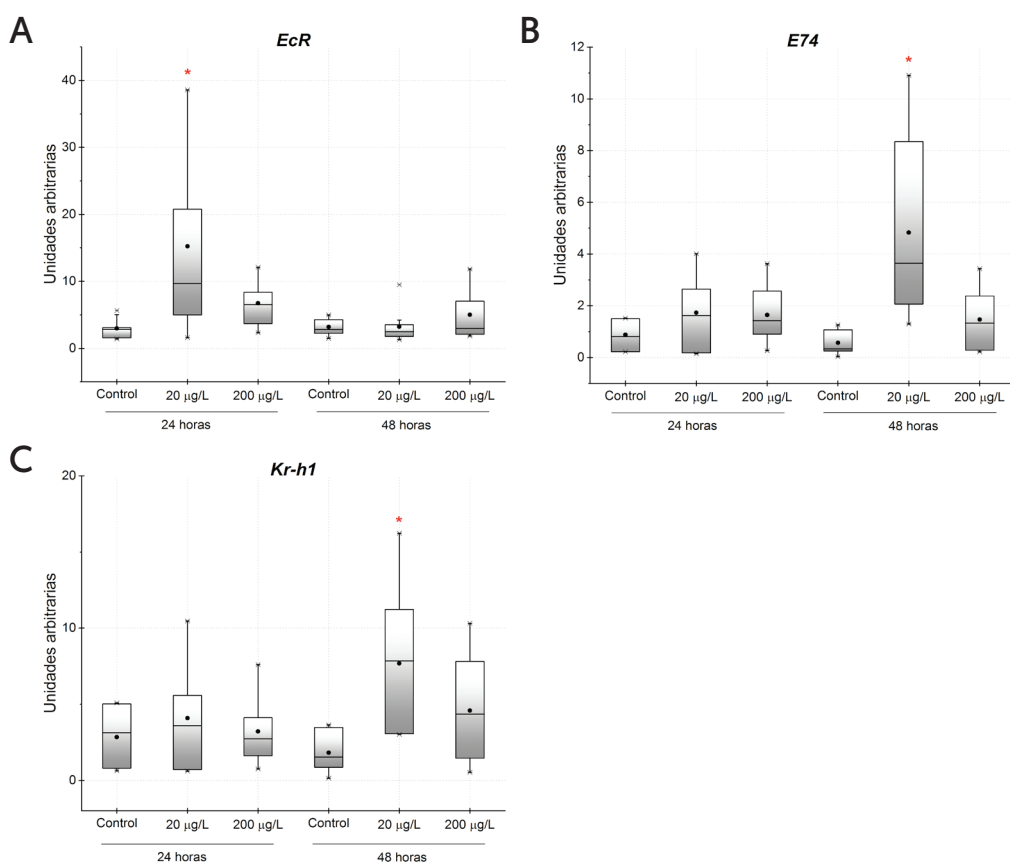


FIGURA 12. Efectos de la Vinclozolina sobre los genes los genes *EcR*, *E74* y *Krh-1* de *C. riparius*, relacionados con el sistema endocrino. Análisis de expresión en larvas expuestas a 20 y 200 µg/L de Vz durante 24 y 48 horas. Las gráficas representan los valores medios de la expresión, donde la línea horizontal dentro del recuadro indica la mediana, los límites del recuadro indican los percentiles 25 y 75 y los bigotes representan los valores más altos y más bajos. La media está representada por un pequeño círculo dentro de la caja. El número de larvas para cada condición es siete ($n = 7$). Para los datos distribuidos normalmente, las diferencias significativas se compararon utilizando ANOVA [*EcR*], mientras que para los datos no normales se usó Kruskal-Wallis [*E74*, *Krh-1*], [$* p \leq 0.05$].

Una posible diana de los disruptores endocrinos es el metabolismo de hormonas. Para valorar si la Vz tenía algún efecto sobre el metabolismo de la ecdisona se estudiaron los niveles de actividad de los genes *Disembodied* [*DIS*] y el citocromo P450 18a1 [*Cyp18A1*], puesto que codifican para enzimas implicadas en la síntesis e inactivación de esta hormona respectivamente [Guittard et al., 2011; Rewitz et al., 2006]. *DIS* es una enzima de la familia del citocromo P450, también conocida como *Cyp302a1*, que participa en la síntesis de la ecdisona a partir del colesterol. *Cyp18a1*, también es una enzima de la familia de los citocromos P450, pero participa

en la inactivación de la forma activa de la hormona. Cuando se analizó el nivel de ARNm de *DIS*, no se detectaron cambios a ninguna de las concentraciones ni de los tiempos analizados [Figura 13A]. Sin embargo, al analizar la actividad transcripcional de *Cyp18a1* se detectó un aumento en los niveles del ARNm en la concentración de 20 $\mu\text{g/L}$ a 48 horas [Figura 13B]. Este resultado sugiere que la Vz puede afectar el proceso de eliminación de la forma activa de la ecdisona.

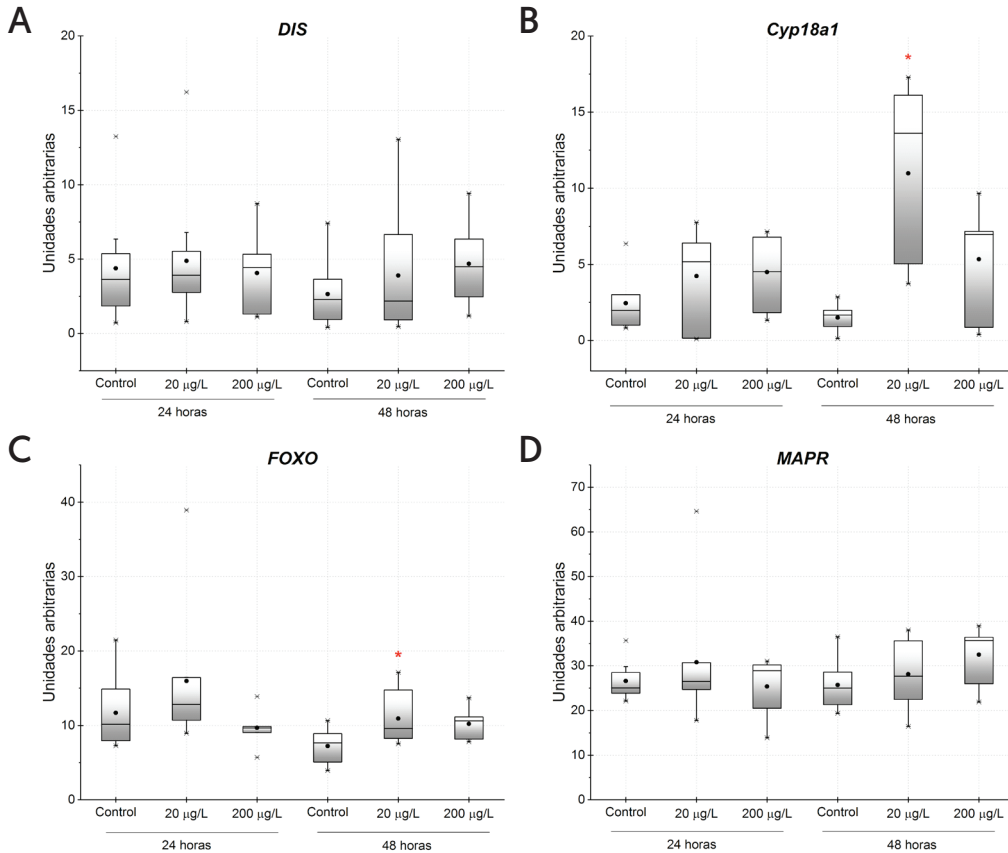


FIGURA 13. Efectos de la Vinclozolina sobre los genes *DIS*, *Cyp18a1*, *FOXO* y *MAPR* de *C. riparius*, relacionados con el sistema endocrino. Análisis de expresión en larvas expuestas a 20 y 200 $\mu\text{g/L}$ de Vz durante 24 y 48 horas. Las gráficas representan los valores medios de la expresión, donde la línea horizontal dentro del recuadro indica la mediana, los límites del recuadro indican los percentiles 25 y 75 y los bigotes representan los valores más altos y más bajos. La media está representada por un pequeño círculo dentro de la caja. El número de larvas para cada condición es siete ($n = 7$). Para los datos distribuidos normalmente, las diferencias significativas se compararon utilizando ANOVA [*DIS*], mientras que para los datos no normales se usó Kruskal-Wallis [*Cyp18a1*, *FOXO*, *MAPR*], [* $p \leq 0.05$].

El sistema endocrino de insectos es, dentro de los invertebrados, de los mejor conocidos. Además de la ecdisona, existen otras hormonas, como el péptido similar a la insulina. Aunque no es común analizar el efecto que tienen los disruptores endocrinos sobre esta hormona, en el presente trabajo se planteó la posibilidad

de que la Vz afectara también a otras rutas endocrinas diferentes a la respuesta a ecdisona. Para analizar esta posibilidad, se seleccionó el gen *FOXO*. Este gen codifica a una proteína implicada en la vía de respuesta al péptido equivalente a la insulina e interviene en procesos celulares tan importantes como la regulación de la apoptosis, el ciclo celular y la resistencia frente a la oxidación celular. Los resultados obtenidos mostraron que su activación se produjo únicamente a las 48 h cuando las larvas fueron expuestas a 20 µg/L de Vz [Figura 13C]. Por último, se analizó el efecto sobre el gen que codifica para el receptor huérfano MAPR. El estudio de los niveles de ARNm de este gen mostró que no se detectaban cambios significativos en sus niveles en las condiciones estudiadas [Figura 13D].

5.1.2.2. Efectos de la Vinclozolina en la respuesta a estrés celular

La respuesta de estrés celular, se analizó mediante la determinación de los niveles de expresión de los genes *Hsp24*, *Hsp70* y *Gp93*, tres genes que codifican para miembros de la familia de proteínas de choque térmico. La *Hsp24* es una proteína de bajo peso molecular y aunque desempeña un papel crucial en la respuesta celular frente a contaminantes ambientales, también está involucrada en un gran número de procesos biológicos que incluyen el propio desarrollo, diferenciación y apoptosis [Bakthisaran et al., 2015; Morrow et al., 2015]. Por otro lado, la *Hsp70* es la proteína de respuesta a estrés que más frecuentemente se activa en presencia de un agente químico o físico que altera la fisiología celular. Por último, el gen *Gp93*, que codifica para una proteína de la familia de las *Hsp90*. El análisis de estos genes después de 24 horas de tratamiento mostró unos niveles similares a los controles para todas las concentraciones evaluadas. Sin embargo, a las 48 horas sí se produce un aumento en sus niveles de ARNm que es estadísticamente significativo para la concentración más baja evaluada [20 µg/L] [ver Figura 14]. De acuerdo con estos datos, se puede decir que la Vz es capaz de alterar la respuesta frente a estrés celular aunque no de forma dosis-dependiente.

5.1.2.3. Efectos de la Vinclozolina sobre el sistema de detoxificación celular

La eliminación y neutralización de sustancias extrañas ajenas al organismo se realiza en un proceso que implica diferentes etapas en las que intervienen distintas enzimas, que evitan su bioacumulación una vez que dichas sustancias han accedido al organismo. Como ya se mencionó en el apartado 2.4.2, los mecanismos de detoxificación implican una fase I, en la que se produce la oxidación, reducción o hidrólisis de la sustancia por medio de, entre otras, enzimas pertenecientes a la superfamilia citocromo P450. La siguiente fase, o fase II, consiste en reacciones de conjugación con distintos compuestos polares por medio de transferasas. La activación de ambas fases de detoxificación tras exposición a Vz, se estudió a través del análisis de los niveles de expresión del gen *Cyp4G*, perteneciente a la fase I, y del gen de la glutatión-S-transferasa delta 3 [*GstD3*], que se encuentra relacionada con la defensa antioxidante, en la fase II.

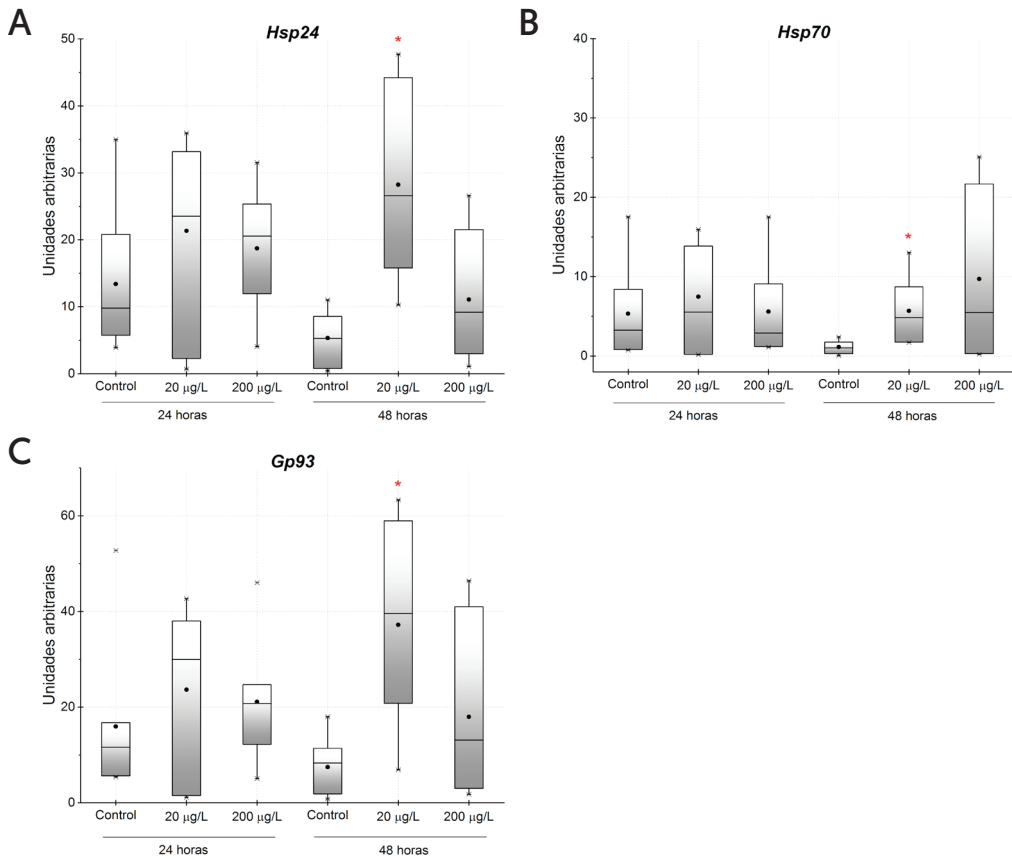


FIGURA 14. Efectos de la Vinclozolin sobre genes de *C. riparius* relacionados con la respuesta a estrés celular. Análisis de expresión del ARNm de los genes *Hsp24*, *Hsp70* y *Gp93* de larvas expuestas a 20 y 200 µg/L de Vinclozolin durante 24 y 48 horas. Las gráficas representan los valores medios de la expresión, donde la línea horizontal dentro del recuadro indica la mediana, los límites del recuadro indican los percentiles 25 y 75 y los bigotes representan los valores más altos y más bajos. La media está representada por un pequeño círculo dentro de la caja. El número de larvas para cada condición es siete ($n = 7$). Las diferencias se compararon utilizando Kruskal-Wallis, [$* p \leq 0.05$].

Como se puede observar en la Figura 15A, *Cyp4G* aumenta su actividad tras 24 horas de exposición, pero solo para la concentración de 20 µg/L. Esta activación desaparece a las 48 horas, obteniéndose valores muy similares al control. Por otro lado, el análisis de los niveles de ARNm del gen *GstD3* mostró a las 24 horas de exposición una tendencia de aumento cuando las larvas fueron expuestas a 200 µg/L de Vz y, que también desaparecieron transcurridas 48 horas [Figura 15B]. Estos resultados sugieren que la Vz puede activar la fase I y la fase II, si bien esta activación temprana de los mecanismos de detoxificación no parece mantenerse en el tiempo.

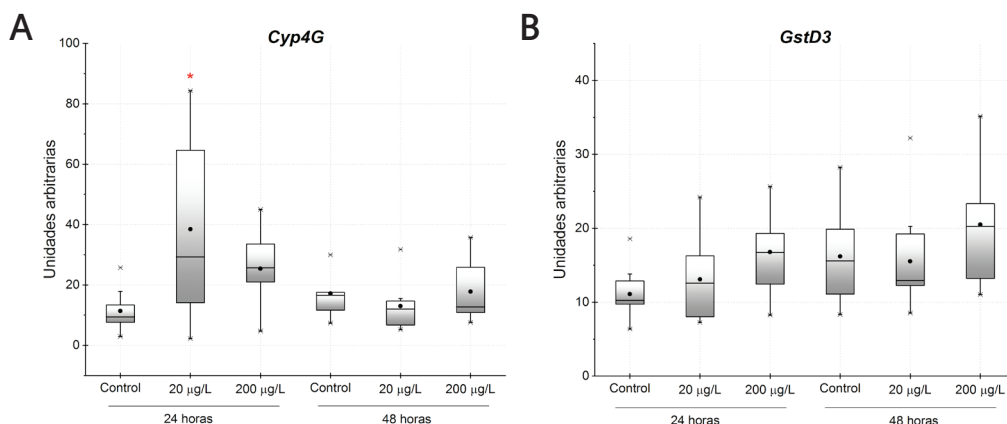


FIGURA 15. Efectos de la Vinclozolina sobre el sistema de detoxificación celular de *C. riparius*. Análisis de expresión del ARNm de los genes *Cyp4G*, y *GstD3* de larvas expuestas a 20 y 200 µg/L de Vinclozolina durante 24 y 48 horas. Las gráficas representan los valores medios de la expresión, donde la línea horizontal dentro del recuadro indica la mediana, los límites del recuadro indican los percentiles 25 y 75 y los bigotes representan los valores más altos y más bajos. La media está representada por un pequeño círculo dentro de la caja. El número de larvas para cada condición es siete ($n = 7$). Las diferencias se compararon utilizando ANOVA, [$* p \leq 0.05$].

5.1.3. Efectos genotóxicos de la Vinclozolina

El estudio de la genotoxicidad de un xenobiótico, resulta de gran relevancia pues un daño en el ADN produce inestabilidad genómica, la cual puede comprometer la viabilidad celular. En este apartado, se aborda una doble evaluación de los efectos de la Vz: por un lado se valoró la genotoxicidad de la Vz propiamente dicha mediante el ensayo cometa y por otro lado se analizaron genes relacionados con la reparación del daño al ADN.

5.1.3.1. Ensayo cometa

El ensayo cometa es un método de uso habitual para el análisis del daño que se produce en el ADN. La valoración se realizó a partir de una serie de parámetros: el porcentaje de ADN en cola, la longitud de la cola, el momento cola y el momento oliva, que son considerados como los más representativos de este ensayo de genotoxicidad. Como se puede observar en la Figura 16A, el porcentaje de ADN en la cola, que indica el daño total producido por el compuesto, muestra una clara inducción cuando las larvas se expusieron a 20 y 200 µg/L. Al analizar el momento oliva, que aporta información relativa al daño total al ADN con respecto al tamaño medio de los fragmentos, se observa una respuesta dosis dependiente con aumento estadísticamente significativo para ambas concentraciones [Figura 16D]. Por otro lado, tanto la longitud de cola [Figura 16B] que se refiere a la distancia de migración del ADN desde la cabeza del cometa hasta el extremo de la cola, como el momento cola [Figura 16C], que relaciona el daño total con el fragmento más pequeño muestran una vez más una clara inducción dosis-dependiente con un aumento estadísticamente significativo para ambas concentraciones.

Estos resultados muestran en conjunto una clara inducción de roturas de ADN, lo que evidencia un daño genotóxico en larvas de *C. riparius* por exposición a Vz a las concentraciones estudiadas.

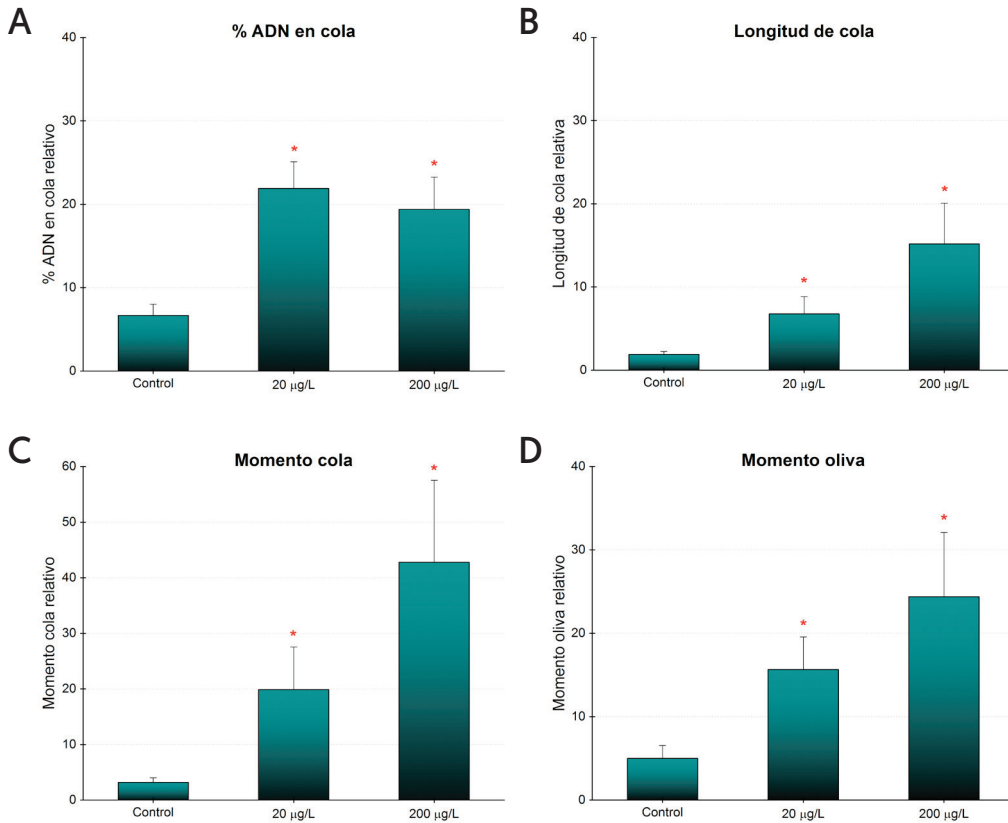


FIGURA 16. Análisis del efecto genotóxico en el ADN de larvas de *C. riparius* expuestas a 20 y 200 µg/L de Vinclozolina durante 24 horas. Daño en el ADN representado mediante el porcentaje de ADN en cola, la longitud de la cola, el momento cola y el momento oliva. Los valores representan la media y el error estándar de la media, para las mediciones tomadas en tres experimentos [n = 13 larvas]. Las diferencias se compararon utilizando ANOVA, [* p ≤ 0.05].

5.1.3.2. Efectos de la Vinclozolina en la expresión de genes relacionados con el daño al ADN

El daño al ADN supone un riesgo para el individuo, pero también para la población a largo plazo. Una vez producido, el organismo puede activar los mecanismos de reparación y estos pueden revertir el efecto genotóxico. Con el objetivo de evaluar si tras la exposición de Vz se activan estos mecanismos, se seleccionaron cuatro genes que se encuentran involucrados en procesos de reparación del ADN. Los genes seleccionados fueron: el gen *ATM*, por tratarse de una proteína que media en la respuesta frente a roturas de doble cadena del ADN [Guleria and Chandna, 2016; IJIMA et al., 2008], el gen *XRCC1*, que codifica para una proteína de reparación

por escisión de base involucrada en los procesos de reparación de rotura de una sola hebra [Brem and Hall, 2005; London, 2015]; el gen *DECAY* que resulta esencial en la señalización apoptótica [Dorstyn et al., 1999]; y por último, el gen *NLK* relacionado con mecanismos de reparación del daño al ADN, al intervenir en la activación de p53 y por tanto inducir la respuesta de la célula ante el daño del ADN [Zhang et al., 2014].

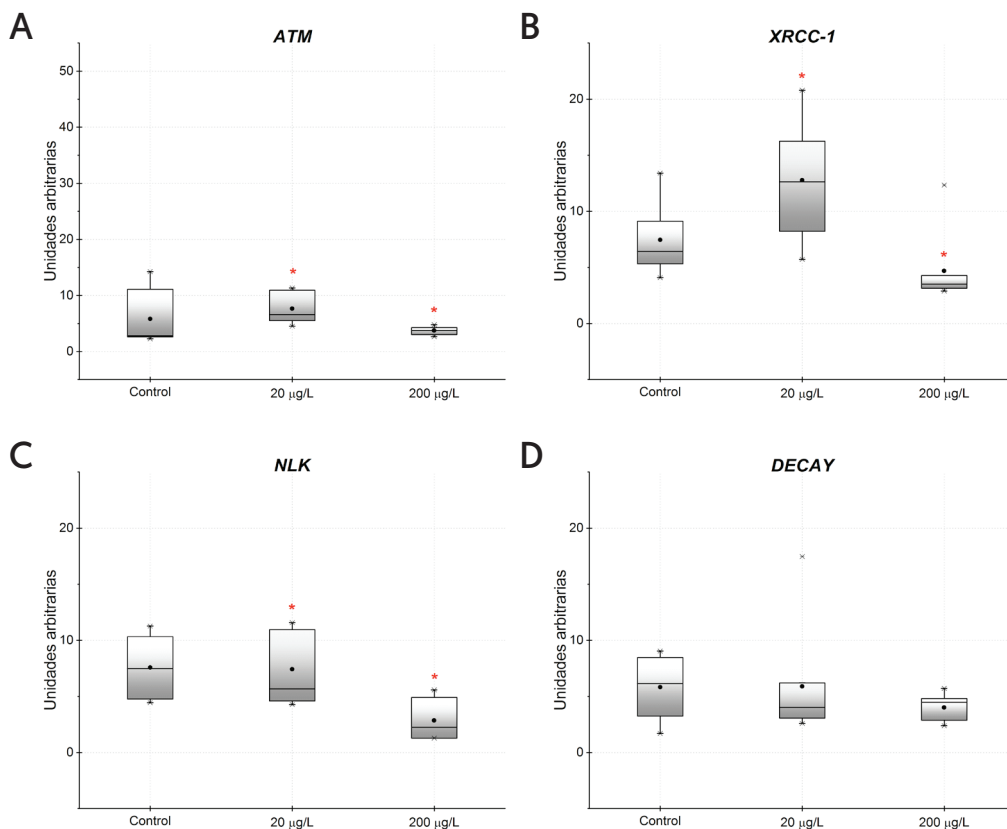


FIGURA 17. Efecto de la Vinclozolina sobre genes de *C. riparius* relacionados con el daño al ADN. Análisis de expresión del ARNm de los genes *ATM*, *XRCC-1*, *NLK* y *DECAY* de larvas expuestas a 20 y 200 µg/L de Vinclozolina durante 24 horas. Las gráficas representan los valores medios de la expresión, donde la línea horizontal dentro del recuadro indica la mediana, los límites del recuadro indican los percentiles 25 y 75 y los bigotes representan los valores más altos y más bajos. La media está representada por un pequeño círculo dentro de la caja. El número de larvas para cada condición es siete [n = 7]. Las diferencias se compararon utilizando Kruskal-Wallis, [* p ≤ 0.05].

Como se puede observar en la Figura 17A, el gen *ATM* mostró un aumento estadísticamente significativo en larvas expuestas a 20 µg/L, mientras que a 200 µg/L se observa una inhibición. Los niveles de ARNm de *XRCC-1* [Figura 17B] presentan una tendencia similar a la observada para *ATM*, con un aumento a 20 µg/ y una inhibición a 200 µg/L. Por otro lado, *NLK* mostró una respuesta dosis-dependiente con una disminución en presencia de ambas concentraciones [Figura 17C]. Finalmente, la

expresión de *DECAY* se mantuvo muy similar a los niveles observados del control y no se observaron efectos estadísticamente significativos tras la exposición a Vz [Figura 17D]. Estos resultados indican que todos los genes analizados relacionados con procesos de reparación del ADN [*ATM*, *NLK* y *XRCC-1*] se alteran mientras que el gen relacionado con la apoptosis [*DECAY*] no varía su actividad transcripcional.

5.2. Exposición crónica en sistemas agua-sedimento de larvas de *Chironomus riparius*. Efectos en el desarrollo y la reproducción

Los efectos crónicos de la exposición a Vz a las concentraciones de 2, 20, 200 y 2000 µg/L en sistemas agua-sedimento se evaluaron mediante tres parámetros según las recomendaciones de la OECD [OECD, 2010]: la tasa de desarrollo, que representa la proporción de desarrollo larvario que tiene lugar en un día, el ratio de emergencia de adultos, y el número de masas depositadas por hembra [fecundidad]. Los efectos en el desarrollo [tasa de desarrollo y emergencia de adultos] pueden afectar al número de individuos en fase adulta con posibilidades de reproducirse, lo que junto con su éxito reproductivo son determinantes para la supervivencia de una población.

La tasa de desarrollo [Figura 18A], fue ligeramente superior a las concentraciones de Vz más altas [200 y 2000 µg/L]. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas, por lo que la Vz no produjo un efecto en el ritmo de desarrollo larvario hacia la fase adulta. Cuando se observa el ratio de emergencia [Figura 18B], es decir el número de larvas que llegan a la fase adulta al final del ensayo, se puede ver que en la concentración menor [2 µg/L] se alcanzó un mayor número de individuos en la fase adulta. Sin embargo, este aumento no resultó significativo volviendo a los niveles del control en el resto de concentraciones analizadas. Los efectos sobre la reproducción se analizaron mediante el cálculo de la fecundidad [número de puestas/número de hembras]. Este parámetro mostró una tendencia de aumento progresivo con la concentración, si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas [Figura 18C]. En resumen, los efectos de la Vz en el desarrollo y reproducción de *C. riparius* no fueron significativos, aunque se observó un comportamiento diferente respecto del control que varió según la concentración y el parámetro utilizado. Teniendo en cuenta los efectos transgeneracionales descritos para la Vz [Anway et al., 2005], este ensayo se extendió con la fase embrionaria exponiéndola al mismo tratamiento a la que estuvo expuesta la fase larvaria parental. Dichos resultados se presentan en el apartado 5.3.

5.3. Efectos de la Vinclozolina sobre embriones de *Chironomus riparius*

La fase embrionaria, se caracteriza por ser la más sensible en el ciclo de vida de un organismo vivo. Una vez que la hembra deposita la masa de huevos, el desarrollo embrionario de *C. riparius* tiene lugar en aproximadamente 3 o 4 días hasta la eclosión del primer estadio larvario. Durante este tiempo se producen numerosos cambios en

la expresión de genes relacionados con procesos que regulan la embriogénesis. Los tratamientos en embriones con Vz se llevaron a cabo con masas de huevos divididas en dos partes iguales con la finalidad de evitar efectos por diferencias en la fase de desarrollo embrionario de los huevos expuestos, ya que los huevos de una misma puesta progresan de manera sincrónica [ver Figura 10].

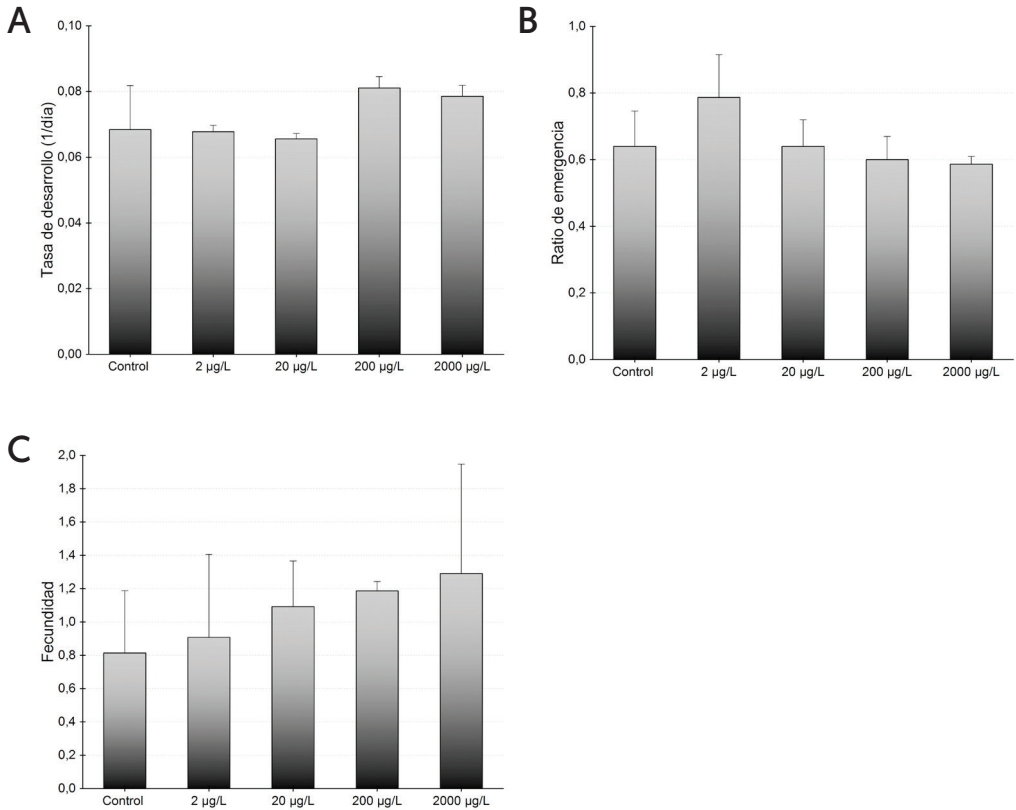


FIGURA 18. Efectos de la Vinzclozolina sobre la tasa de desarrollo [A], el ratio de emergencia de adultos [mosquitos] [B] y la fecundidad [puestas totales/número de hembras] [C] de *C. riparius*. Los valores representan la media y el error estándar [SE] de tres réplicas ($n = 75$ larvas). Las diferencias se compararon utilizando ANOVA.

5.3.1. Efectos embriotóxicos

Los efectos embriotóxicos se analizaron mediante el porcentaje de eclosión, permitiendo obtener los efectos sobre la viabilidad del embrión. Los embriones fueron expuestos durante 48 horas a 2, 20 y 200 µg/L de Vz, aproximadamente entre las 24 horas después de la ovoposición y hasta el momento de la eclosión. Se contabilizó el porcentaje de huevos eclosionados de la mitad de la masa no expuesta [control] y de la mitad tratada. Los efectos embriotóxicos se estudiaron en embriones procedentes de cultivos [es decir provenientes de una generación de parentales no expuestos] y de embriones procedentes del ensayo de exposición crónica en sistemas

agua-sedimento descrito en el apartado 5.2 [generación parental expuesta]. Como se muestra en la Figura 19, la exposición a 2, 20 y 200 $\mu\text{g/L}$ de Vz retrasa de manera significativa la eclosión de los embriones procedentes de una generación parental no expuesta. Además se observa una inhibición total de la eclosión a la concentración de 200 $\mu\text{g/L}$ en embriones obtenidos tras exponer a la generación parental [Figura 19B], aumentando por tanto la sensibilidad de la fase embrionaria con respecto a la no exposición previa de sus progenitores en esta concentración.

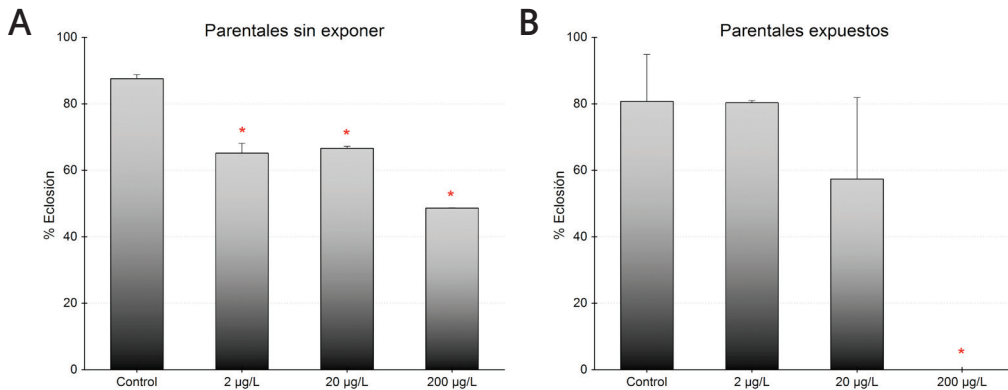


FIGURA 19. Porcentaje de eclosión de embriones de *C. riparius* tras la exposición a 2, 20, 200 $\mu\text{g/L}$ de Vinclozolina. Resultados obtenidos en embriones provenientes de generación parental sin exponer [A] y de parentales expuestos [B]. Las diferencias se compararon utilizando ANOVA, [* $p \leq 0.05$].

5.3.2. Efectos en la expresión génica

Con el fin de obtener información sobre los mecanismos moleculares que podrían relacionarse con una disminución de la viabilidad del embrión tras exposición a Vz se estudió la expresión de distintos genes relacionados con la ruta hormonal de la ecdisona y con la respuesta a estrés celular. La expresión génica en embriones se estudió a dos tiempos de exposición [8 y 24 horas] con el fin de establecer paralelismos con los estudios de expresión génica con larvas [24 y 48 horas] a las mismas concentraciones utilizadas en la fase larvaria [20 y 200 $\mu\text{g/L}$ de Vz].

5.3.2.1. Efecto de la Vinclozolina sobre genes relacionados con el sistema endocrino

Para la realización de estos experimentos, al igual que en los ensayos de embriotoxicidad, las masas de huevos se dividieron en dos partes iguales. Como se puede observar en la Figura 20A, transcurridas 8 horas de tratamiento se produce una activación de la expresión del gen *EcR* con 20 $\mu\text{g/L}$ y un efecto contrario con la concentración de 200 $\mu\text{g/L}$. Este hecho se repite a las 24 horas de manera más pronunciada [Figura 20B]. El comportamiento del factor de transcripción *E74* íntimamente relacionado con el *EcR*, fue similar. Se observa un aumento en los niveles de expresión del ARNm cuando los embriones se exponen a 20 $\mu\text{g/L}$, tanto a

las 8 horas [Figura 20C] como a las 24 horas [Figura 20D], y una fuerte inhibición con 200 $\mu\text{g/L}$ con respecto al control en ambos tiempos de exposición.

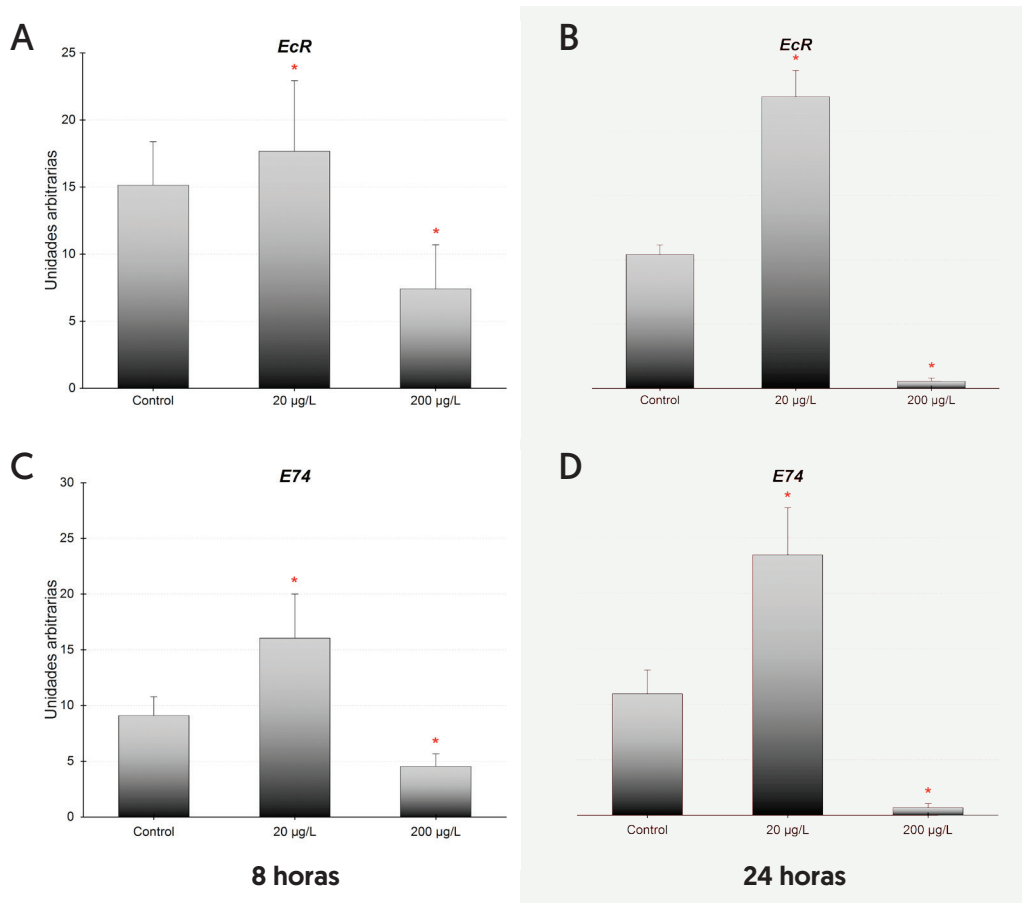


FIGURA 20. Análisis de expresión del ARNm en genes relacionados con el sistema endocrino [*EcR*, *E74*] de embriones de *C. riparius* expuestos a 20 y 200 $\mu\text{g/L}$ de Vinclozolin durante 8 y 24 horas. Los valores representan la media y el error estándar de la media, para las mediciones tomadas en tres experimentos independientes. Las diferencias se compararon utilizando ANOVA, [* $p \leq 0.05$].

La HJ resulta esencial para procesos como la metamorfosis y la reproducción en insectos, cobrando mayor importancia en etapas tempranas del desarrollo [ver apartado 2.4.1], por ello resulta de gran importancia el análisis de sus receptores como MET. En la Figura 21A se muestra una clara inducción de los niveles de ARNm del gen *MET* a las 8 horas y 20 $\mu\text{g/L}$ de exposición en embriones. Sin embargo, 200 $\mu\text{g/L}$ y el resto de tiempos analizados se mantienen los niveles iguales con respecto a los controles. El receptor de progesterona asociado a membrana [MAPR] media en diferentes mecanismos celulares de respuesta rápida. No obstante, su papel fisiológico sigue siendo desconocido ya que se desconoce su ligando [Mifsud and Bateman, 2002]. En la Figura 21C se muestra que hay una sobreexpresión de *MAPR* tras 8 horas y 20 $\mu\text{g/L}$ de exposición, mientras que a las 24 horas se observa su

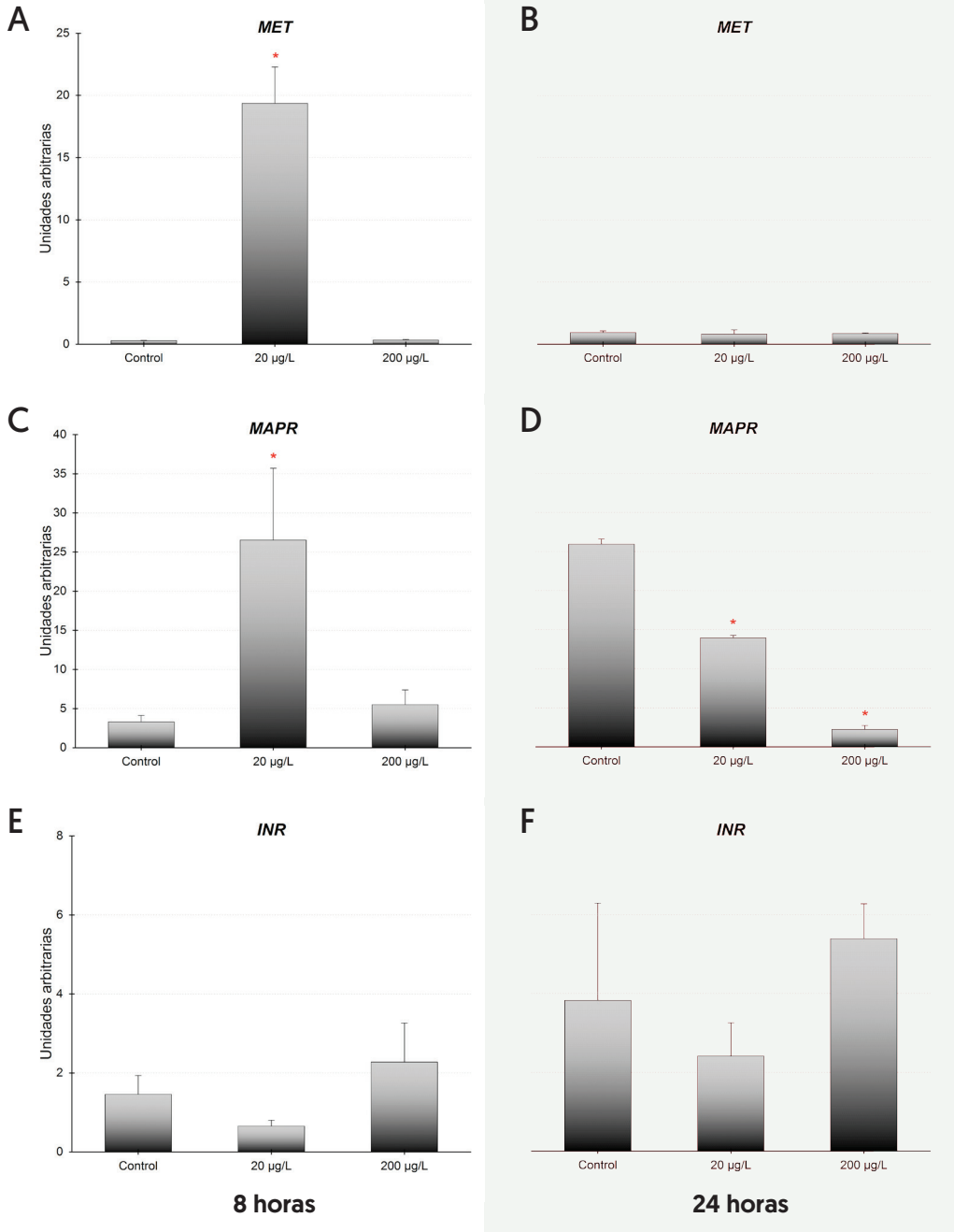


FIGURA 21. Análisis de expresión del ARNm en genes relacionados con el sistema endocrino [*MET*, *MAPR* e *INR*] de embriones de *C. riparius* expuestos a 20 y 200 µg/L de Vinclozolin durante 8 y 24 horas. Los valores representan la media y el error estándar de la media, para las mediciones tomadas en tres experimentos independientes. Las diferencias se compararon utilizando ANOVA, [* $p \leq 0.05$].

inhibición para 20 y 200 $\mu\text{g/L}$ [Figura 21D]. Por último se estudió la expresión del gen *INR* [del inglés, *Insulin-like receptor*] involucrado en procesos similares al receptor de la insulina, dado que la vía de la insulina en insectos regula el almacenamiento de lípidos y carbohidratos. En las Figuras 21E y 21F se muestra como en los tiempos y concentraciones analizadas no hay diferencias significativas con respecto a los controles en ninguna de las condiciones experimentales.

5.3.2.2. Efecto de la Vinclozolina sobre genes relacionados con la respuesta a estrés celular

Al igual que en el apartado 5.1.2.2 y con el objetivo de evaluar una posible alteración celular provocada por la Vz que pudiese desencadenar una respuesta de estrés celular, se analizaron los niveles de expresión de *Gp93* y los genes de proteínas de estrés [*Hsp40*, *Hsp60*, *Hsp70*]. El análisis del gen *Gp93* no mostró ninguna alteración en los niveles de expresión de su ARNm [Figura 22]. Por el contrario, se observó una fuerte inducción a las 8 horas de la actividad transcripcional de expresión de *Hsp40* cuando los embriones son expuestos a 20 $\mu\text{g/L}$ [Figura 23A]. Al analizar el comportamiento de *Hsp60* se observó una inhibición a las 8 horas y 20 $\mu\text{g/L}$ de Vz [Figura 23C], si bien el efecto contrario se observó a las 24 horas de exposición para los dos tratamientos [20 y 200 $\mu\text{g/L}$] [Figura 23D]. Por otro lado, los niveles de ARNm de *Hsp70* aumentaron de manera estadísticamente significativa a las 8 horas y 20 $\mu\text{g/L}$, mientras que dicho periodo de exposición produjo una inhibición para 200 $\mu\text{g/L}$ [Figura 23E]. La inhibición se transforma en una sobreexpresión muy acusada a las 24 horas, que se puede apreciar con 200 $\mu\text{g/L}$ [Figura 23F].

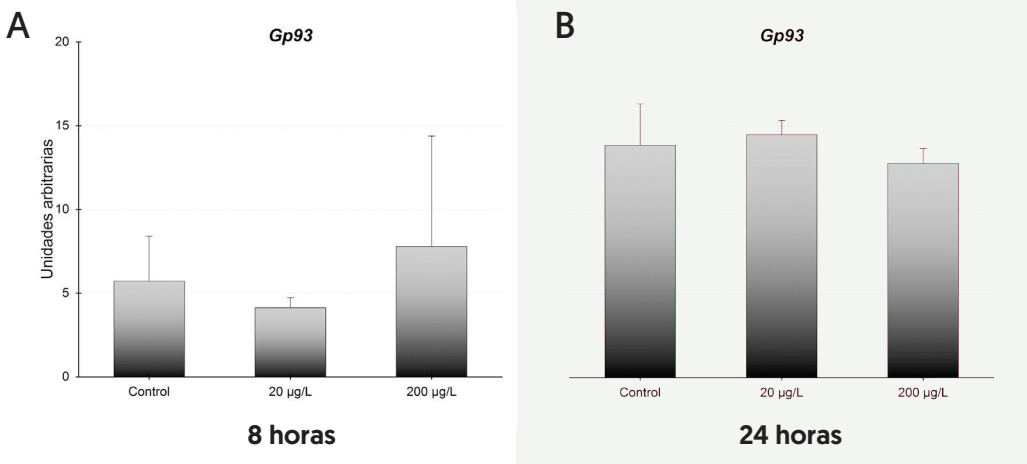


FIGURA 22. Análisis de expresión del ARNm del gen *Gp93*, relacionado con la respuesta a estrés celular de embriones de *C. riparius* expuestos a 20 y 200 $\mu\text{g/L}$ de Vinclozolina durante 8 y 24 horas. Los valores representan la media y el error estándar de la media, para las mediciones tomadas en tres experimentos. Las diferencias se compararon utilizando ANOVA, [* $p \leq 0.05$].

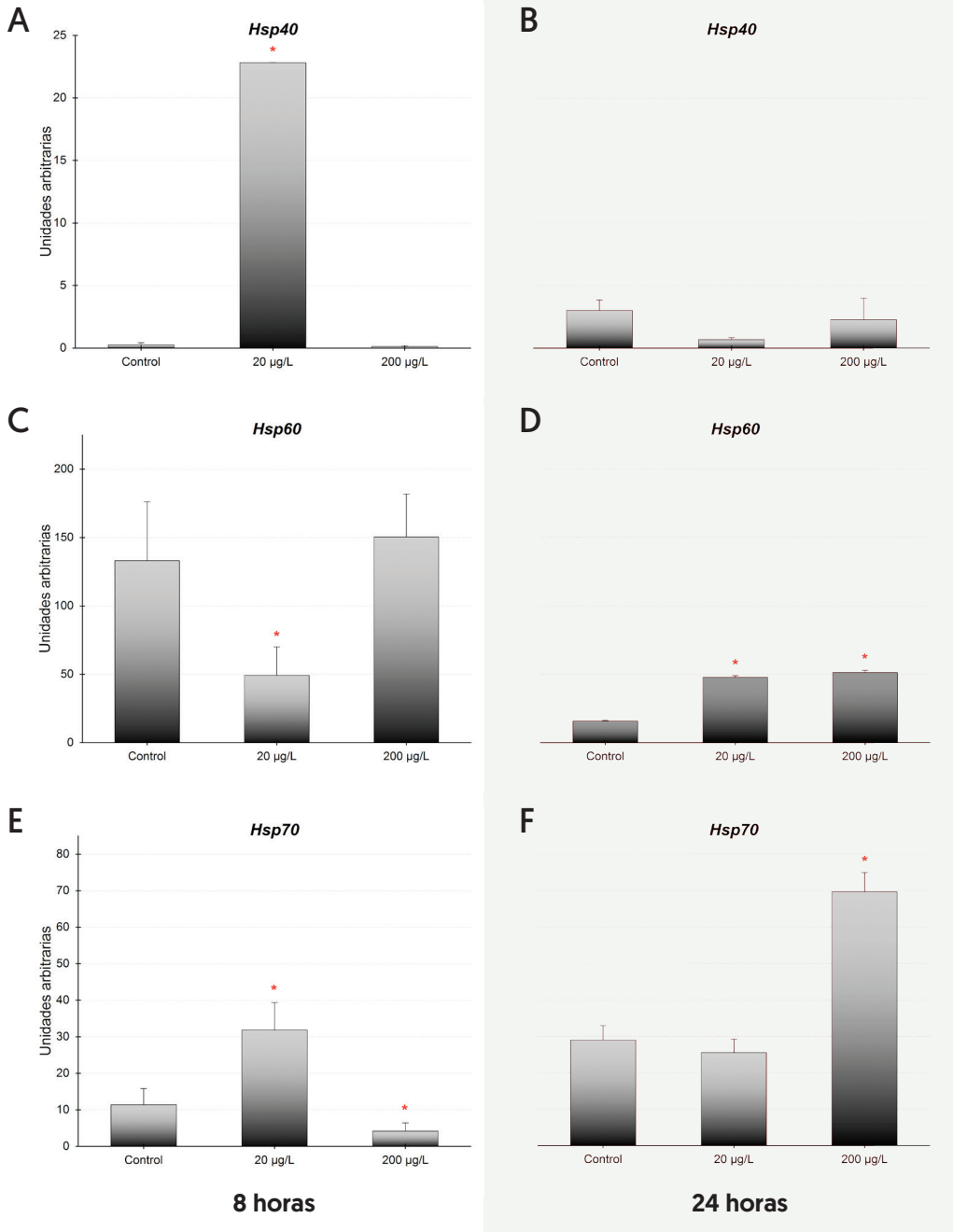


FIGURA 23. Análisis de expresión del ARNm de genes relacionados con la respuesta a estrés celular (*Hsp40*, *Hsp60* y *Hsp70*) de embriones de *C. riparius* expuestos a 20 y 200 µg/L de Vinclozolina durante 8 y 24 horas. Los valores representan la media y el error estándar de la media, para las mediciones tomadas en tres experimentos. Las diferencias se compararon utilizando ANOVA, [* $p \leq 0.05$].

5.4 Exposiciones agudas de Vinclozolina en adultos de *Physa acuta*

5.4.1 Efectos en la supervivencia

La supervivencia de adultos de *P. acuta* se estudió en un rango de concentraciones para la selección de tratamientos posteriores. Los adultos de *P. acuta* se expusieron a 20, 200, 500 y 5000 $\mu\text{g/L}$ de Vz y se observaron los posibles efectos letales cada 24 horas hasta un total de 96 horas. El rango de concentraciones empleado se seleccionó teniendo en cuenta estudios previos con este mismo organismo [Sánchez-Argüello et al., 2012], los cuales se centraban en efectos subletales. Los resultados muestran que la Vz no produjo ningún efecto sobre la supervivencia de los adultos de *P. acuta* [Figura 24]. La supervivencia es igual a la observada para la situación control, incluso a la concentración más alta estudiada [5000 $\mu\text{g/L}$].

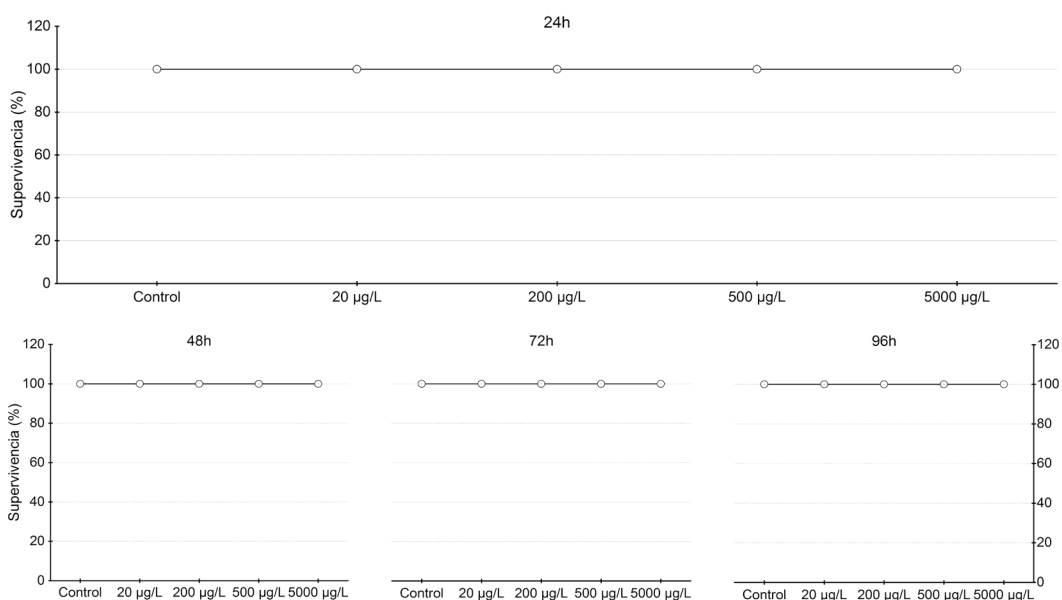


FIGURA 24. Curva de supervivencia de *P. acuta* tras exposición a 20, 200, 500 y 5000 $\mu\text{g/L}$ de Vinclozolina tras 24, 48, 72 y 96 h. Los valores representan la media y el error estándar [SE] de tres experimentos independientes [n = 150].

5.4.2 Efectos en la expresión génica

Para el análisis de los cambios producidos en la expresión de los distintos marcadores moleculares se empleó la RT-PCR, que permite determinar con un alto grado de sensibilidad posibles variaciones en los niveles de ARNm de los genes seleccionados para el estudio. Estos se relacionan con importantes procesos biológicos, como son:

- Genes relacionados con el sistema endocrino.
- La respuesta a estrés celular y el metabolismo celular, incluyendo genes implicados en el mantenimiento de la homeostasis y en la supervivencia celular.

El análisis de la expresión se realizó exponiendo a adultos de *P. acuta* durante 24 horas a las mismas concentraciones de Vz que *C. riparius* y que no producían letalidad: 20 y 200 µg/L.

5.4.2.1. Efectos de la Vinclozolina sobre la expresión de genes relacionados con el sistema endocrino

Con el objetivo de analizar cómo afecta el compuesto al sistema endocrino, se analizó el gen que codifica para el receptor de estrógenos (*ER*) y el gen que codifica para la *Hsp90*, una proteína relacionada con el plegamiento del ER [Eckl and Richter, 2013]. Tal y como se puede observar en la Figura 25, la exposición a 20 y 200 µg/L de Vz, no altera los valores de ninguno de los genes analizados transcurridas 24h. Estos datos sugieren que la exposición a Vz no parece afectar de manera significativa a los genes relacionados con el sistema endocrino analizados.

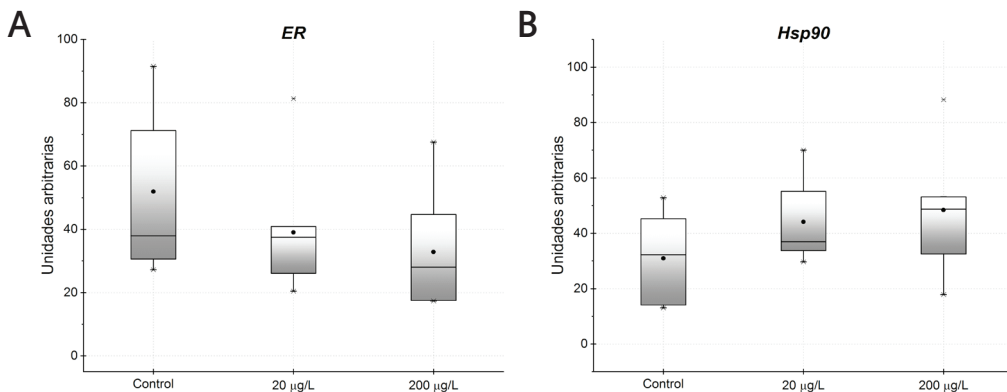


FIGURA 25. Efecto de la Vinclozolina sobre genes relacionados con el sistema endocrino de *P. acuta*. Análisis de expresión del ARNm de los genes *ER* y *Hsp90* de adultos de *P. acuta* expuestos a 20 y 200 µg/L de Vz durante 24 horas. Las gráficas representan los valores medios de la expresión, donde la línea horizontal dentro del recuadro indica la mediana, los límites del recuadro indican los percentiles 25 y 75 y los bigotes representan los valores más altos y más bajos. La media está representada por un pequeño círculo dentro de la caja. El número de adultos para cada condición es siete ($n = 7$). Las diferencias se compararon utilizando ANOVA, [$* p \leq 0.05$].

5.4.2.2. Efectos de la Vinclozolina en la respuesta a estrés celular

Con el objetivo de evaluar una posible alteración celular provocada por la exposición a Vz, que pudiese desencadenar una respuesta de estrés celular, se analizaron los niveles de expresión génica de los genes *Hsp16.6*, *Hsp17*, *Hsp20.4* y *Cu/Zn SOD*. Las HSP de pequeño tamaño son chaperonas involucradas en el

mantenimiento de la homeostasis celular además de su participación en otros procesos, como el desarrollo o la regulación de la apoptosis [Arrigo, 1998; Gu et al., 2012] por ello son un vínculo interesante entre las respuestas celulares y los efectos fisiológicos de los tóxicos. Por su parte, *Cu/Zn SOD* [superóxido dismutasa de cobre/zinc], codifica para una enzima que participa en el estrés oxidativo, eliminando las especies reactivas de oxígeno tanto en el citosol, como en el espacio de la membrana mitocondrial [Valavanidis et al., 2006].

En comparación con el control, observamos una disminución estadísticamente significativa de la actividad transcripcional de *Hsp20.4* a 20 $\mu\text{g/L}$ de Vz [Figura 26C]. Aunque la *Hsp16.6* y *Hsp17* también disminuyeron, las diferencias no fueron estadísticamente significativas [Figura 26A y 26B]. Por su parte, el gen *Cu/Zn SOD* no experimentó cambios, para ninguna de las concentraciones analizadas [20 y 200 $\mu\text{g/L}$] [Figura 26D]. De acuerdo con los datos obtenidos, se puede concluir que el compuesto es capaz de alterar la respuesta a estrés celular inhibiendo significativamente la actividad del gen *Hsp20.4*, y reduciendo ligeramente la expresión de los genes *Hsp16.6* y *Hsp17*, aunque sin alterar *Cu/Zn SOD*.

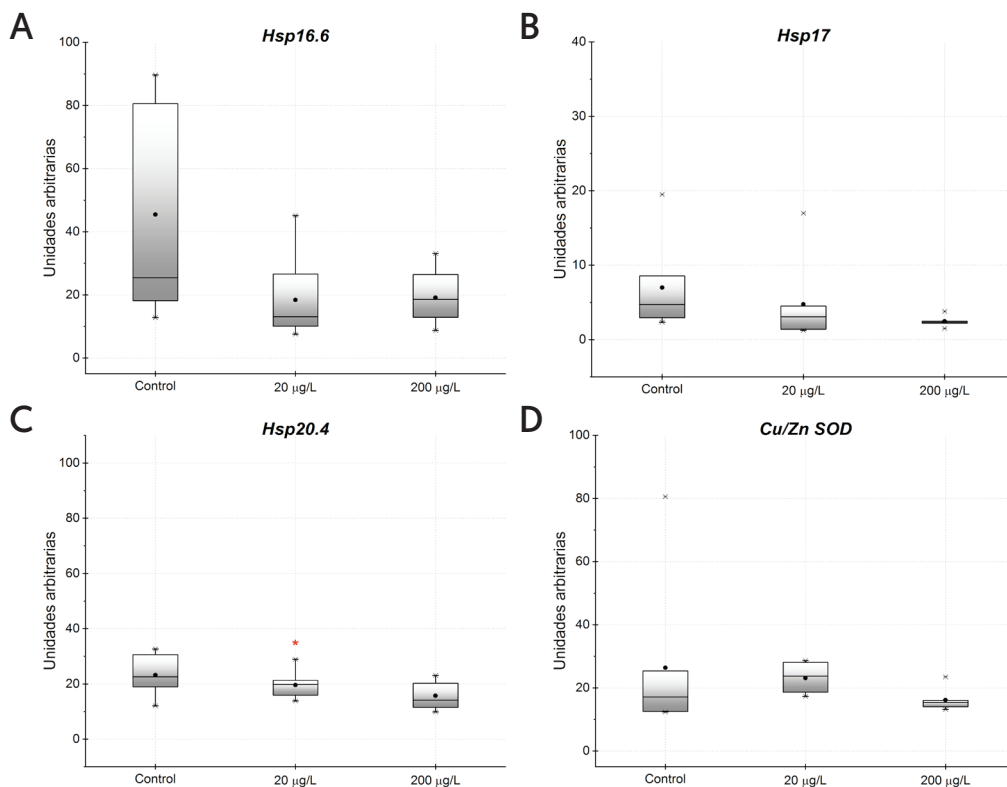


FIGURA 26. Análisis de expresión del ARNm de los genes *Hsp16.6*, *Hsp17*, *Hsp20.4* y *Cu/Zn SOD* en adultos de *P. acuta* expuestos a 20 y 200 $\mu\text{g/L}$ de Vinclozolina durante 24 horas. Las gráficas representan los valores medios de la expresión, donde la línea horizontal dentro del recuadro indica la mediana, los límites del recuadro indican los percentiles 25 y 75 y los bigotes representan los valores más altos y más bajos. La media está representada por un pequeño círculo dentro de la caja. El número de adultos para cada condición es siete ($n = 7$). Las diferencias se compararon utilizando ANOVA, [$* p \leq 0.05$].

5.4.2.3. Efectos sobre el sistema de detoxificación celular

La evaluación de los procesos de detoxificación se realizó a través del estudio de los niveles de expresión de genes relacionados con las tres fases del proceso de detoxificación: tres variantes del gen *Cyp450* [relacionados con la fase I], la expresión de *GSTt2* y *GSTo1* [enzimas relacionadas con la fase II] y el gen de la Multidrug Resistant Protein 1, *MRP1-ABC* [relacionado con la fase III].

En la Figura 27, se muestran los resultados de los niveles de expresión de los genes estudiados. La exposición durante 24 h a 20 y 200 µg/L, no produjo diferencias estadísticamente significativas en los genes analizados. No obstante, hay una inducción de dos de los genes de la fase I de detoxificación [*CYP3A7* y *CYP4F22*] a 20 µg/L [Figuras 27B y 27C]. Esto puede indicar que se está produciendo una activación de los mecanismos de eliminación del xenobiótico. Al analizar los genes relacionados con la fase II, se puede ver que los niveles de actividad tanto para el gen *GSTt2* [Figura 27D], como para *GSTo1* [Figura 27E] presentan niveles similares a los encontrados en los controles. La misma tendencia se observa al analizar el gen *MRP1-ABC* [Figura 27F], es decir niveles de ARNm similares al control. En conjunto, los resultados obtenidos mostraron una tendencia muy similar para ambas concentraciones, aunque sí se observa un aumento para *Cyp4F22* y la *GSTt2* a 20 µg/L. Estos resultados indican que las distintas fases de la detoxificación, no se activan en presencia de la Vz, al contrario que lo descrito para el caso de *C. riparius* [ver apartado 5.1.2.3].

5.4.3. Efectos genotóxicos de la Vinclozolina

Como ya se mencionó en el apartado 5.1.3, en la evaluación del riesgo de un compuesto se requiere el estudio de la genotoxicidad, puesto que el daño en el ADN produce inestabilidad genómica. El estudio de la genotoxicidad de Vz, tal y como se hiciera con *C. riparius*, se abordó desde dos perspectivas: estudio de la genotoxicidad propiamente dicha mediante el ensayo cometa y el análisis de genes relacionados con el daño al ADN [genes de reparación y desencadenantes de muerte celular programada o apoptosis].

5.4.3.1. Ensayo cometa

Los parámetros elegidos del ensayo cometa fueron el porcentaje de ADN en cola, la longitud de la cola, el momento cola y el momento oliva, al igual que en el caso de *C. riparius*. En la Figura 28A se observa que el porcentaje de ADN en la cola muestra una inducción estadísticamente significativa cuando los adultos de *P. acuta* se expusieron a 200 µg/L de Vz. Para los otros tres parámetros analizados [longitud de cola, momento cola y el momento oliva] se observa un aumento estadísticamente significativo para la concentración de 20 µg/L, si bien la concentración de 200 µg/L indujo un aumento, aunque este no fue significativo respecto al control [Figuras 28B, 28C y 28D]. Por tanto, estos resultados muestran un incremento en la frecuencia en la que ocurren roturas de ADN, y por tanto que la exposición a Vz podría provocar daño genotóxico en *P. acuta*.

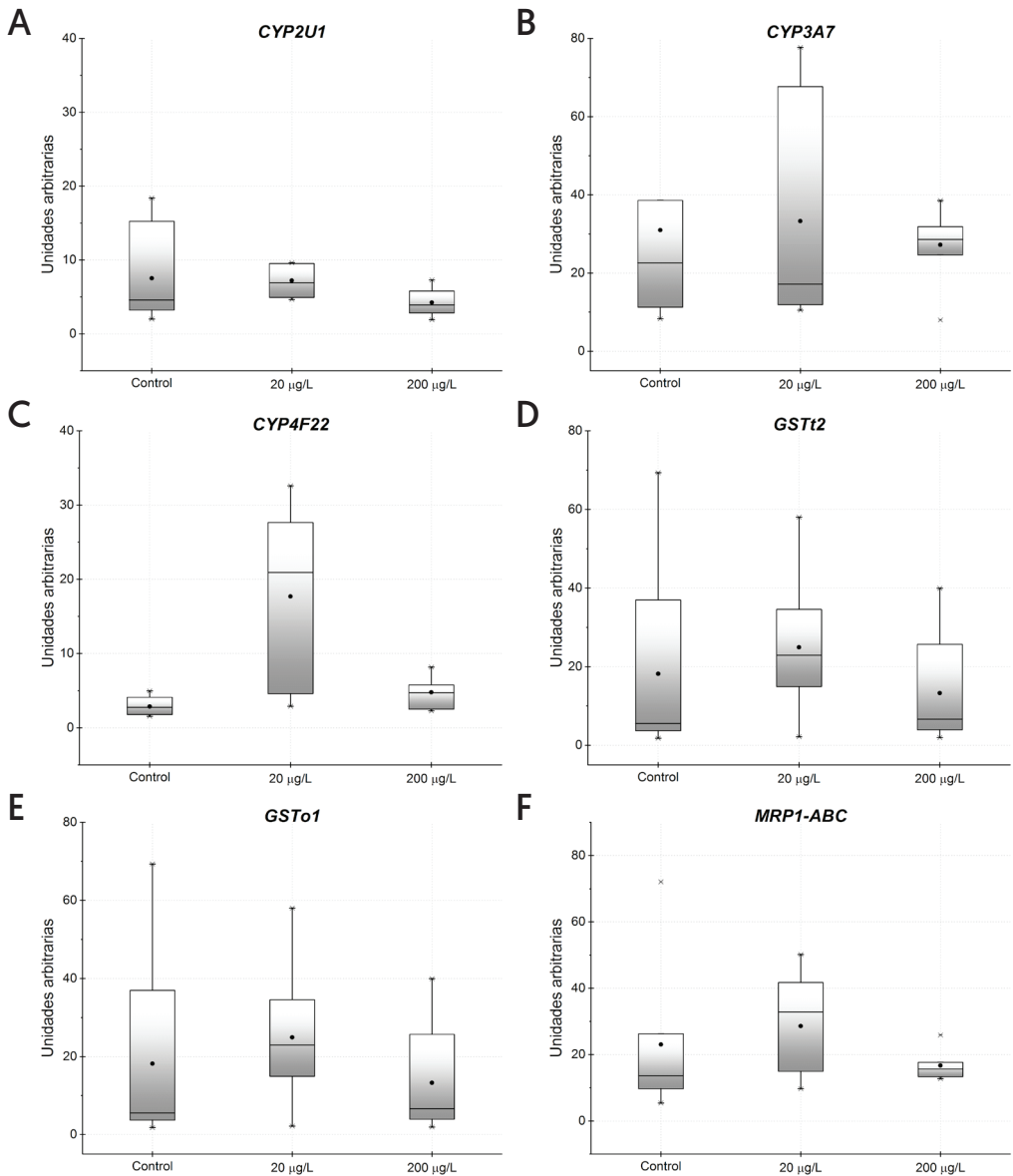


FIGURA 27. Efectos de la Vinclozolina sobre genes relacionados con mecanismos de detoxificación de *P. acuta*. Análisis de expresión del ARNm de los genes *Cyp2U1*, *Cyp3A7*, *Cyp4F22*, *GStt2*, *GSTo1*, *MRP1-ABC* de adultos de *P. acuta* expuestos a 20 y 200 µg/L de Vinclozolina durante 24 horas. Las gráficas representan los valores medios de la expresión, donde la línea horizontal dentro del recuadro indica la mediana, los límites del recuadro indican los percentiles 25 y 75 y los bigotes representan los valores más altos y más bajos. La media está representada por un pequeño círculo dentro de la caja. El número de adultos para cada condición es siete ($n = 7$). Las diferencias se compararon utilizando ANOVA, [* $p \leq 0.05$].

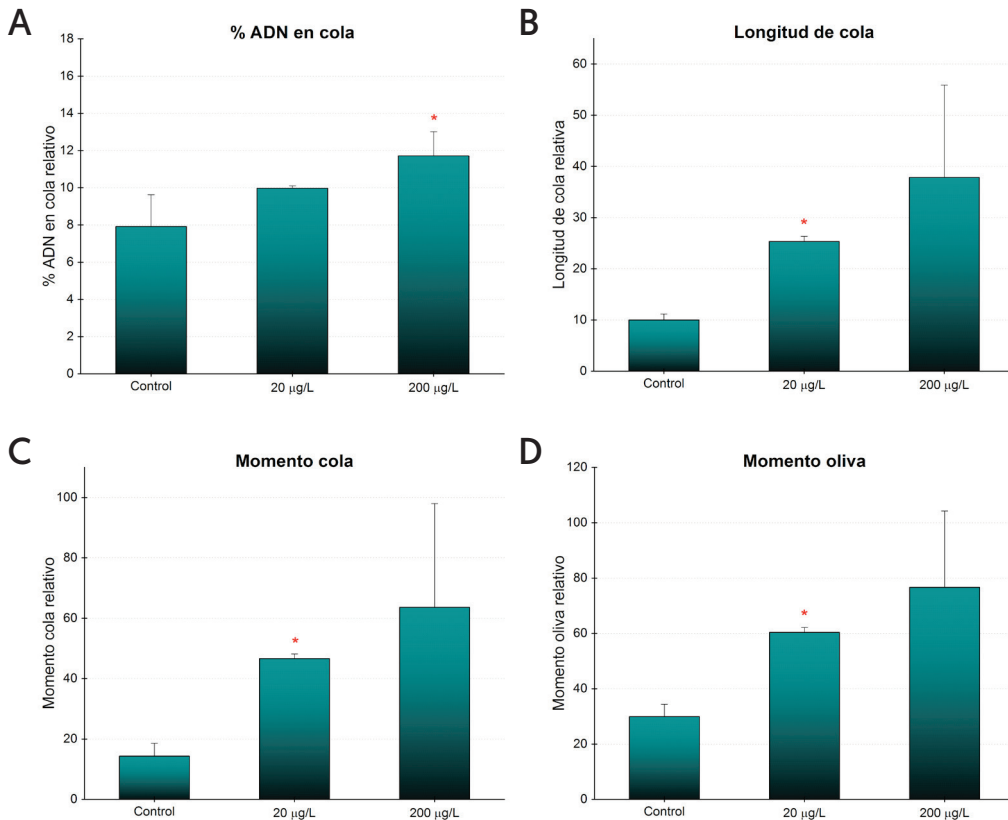


FIGURA 28. Análisis del efecto genotóxico en el ADN de adultos de *P. acuta* expuestos a 20 y 200 µg/L de Vinclozolina durante 24 horas. Daño en el ADN representado mediante el porcentaje de ADN en cola, la longitud de la cola, el momento cola y el momento oliva. Los valores representan la media y el error estándar de la media, para las mediciones tomadas en tres experimentos ($n = 13$ adultos). Las diferencias se compararon utilizando ANOVA, [$* p \leq 0.05$].

5.4.3.2. Efectos de la Vinclozolina en genes relacionados con el daño al ADN

Como ya se mencionó con anterioridad [ver apartado 5.1.3.2], se evaluaron los efectos de la Vz sobre genes relacionados con el daño al ADN. Para ello se seleccionaron siete genes que se encuentran involucrados en procesos de reparación del ADN. El gen *ATM*, relacionado con la respuesta frente a roturas de doble cadena del ADN, y el gen *ATR* que se activa en respuesta a roturas de una única hebra [Stępnik et al., 2015]. Por su parte, el gen *RAD1* [del inglés *Radiation sensitive 1*] codifica para una proteína que se activa para detener la progresión del ciclo celular en respuesta al daño del ADN o a la replicación incompleta. El gen *XPA1*, que codifica para una proteína implicada en la reparación por escisión de nucleótidos [NER, del inglés *Nucleotide excision repair*], una vía importante para reparar gran variedad de daños en el ADN, incluidos los producidos por la radiación UV, los carcinógenos y otros químicos. Por último XRCC-2 y XRCC-4 son proteínas involucradas en la reparación de roturas de doble cadena del ADN mediante recombinación homóloga.

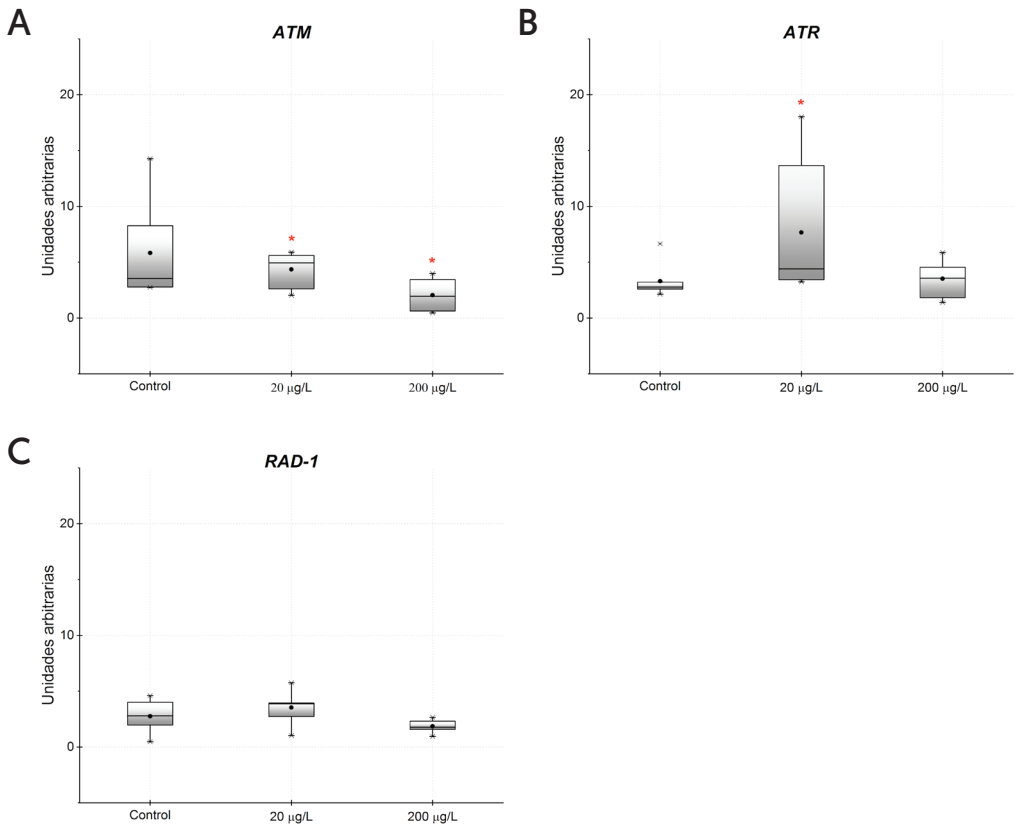


FIGURA 29. Efecto de la Vinclozolina sobre los genes *ATM*, *ATR* y *RAD-1*, relacionados con el daño al ADN en *P. acuta*. Análisis de expresión del ARNm de los genes en adultos de *P. acuta* expuestos a 20 y 200 µg/L de Vinclozolina durante 24 horas. Las gráficas representan los valores medios de la expresión, donde la línea horizontal dentro del recuadro indica la mediana, los límites del recuadro indican los percentiles 25 y 75 y los bigotes representan los valores más altos y más bajos. La media está representada por un pequeño círculo dentro de la caja. El número de individuos para cada caja es siete (n = 7). Las diferencias se compararon utilizando Kruskal-Wallis, [* p ≤ 0.05].

Como se puede ver en la Figura 29A, el gen *ATM* mostró una fuerte inhibición estadísticamente significativa en adultos expuestos a 20 y 200 µg/L. Los niveles de actividad de *ATR*, presentan una fuerte inducción para la concentración más baja evaluada [20 µg/L], mientras que para la concentración de 200 µg/L se mantuvo en niveles similares al control [Figura 29B]. Del mismo modo, los niveles de ARNm de *RAD1* fueron similares a los valores del control para ambas concentraciones [Figura 29C]. Por otro lado la transcripción de *XPA-1* y *XRCC2* mostró una inhibición dosis dependiente con una marcada disminución en presencia de ambas concentraciones [Figuras 30B y 30C]. Por su parte, *CASP3* no muestra alteraciones en los niveles de ARNm [Figura 30D]. Por último *XRCC-4* no manifestó cambios apreciables en los niveles de ARNm [Figura 30D]. Estos resultados sugieren que los genes que se encuentran relacionados con procesos de reparación [*ATM*, *ATR* y *XRCC-2*], se encuentran alterados, mientras que el gen *RAD1*, relacionado con la progresión del ciclo celular, no altera su actividad transcripcional.

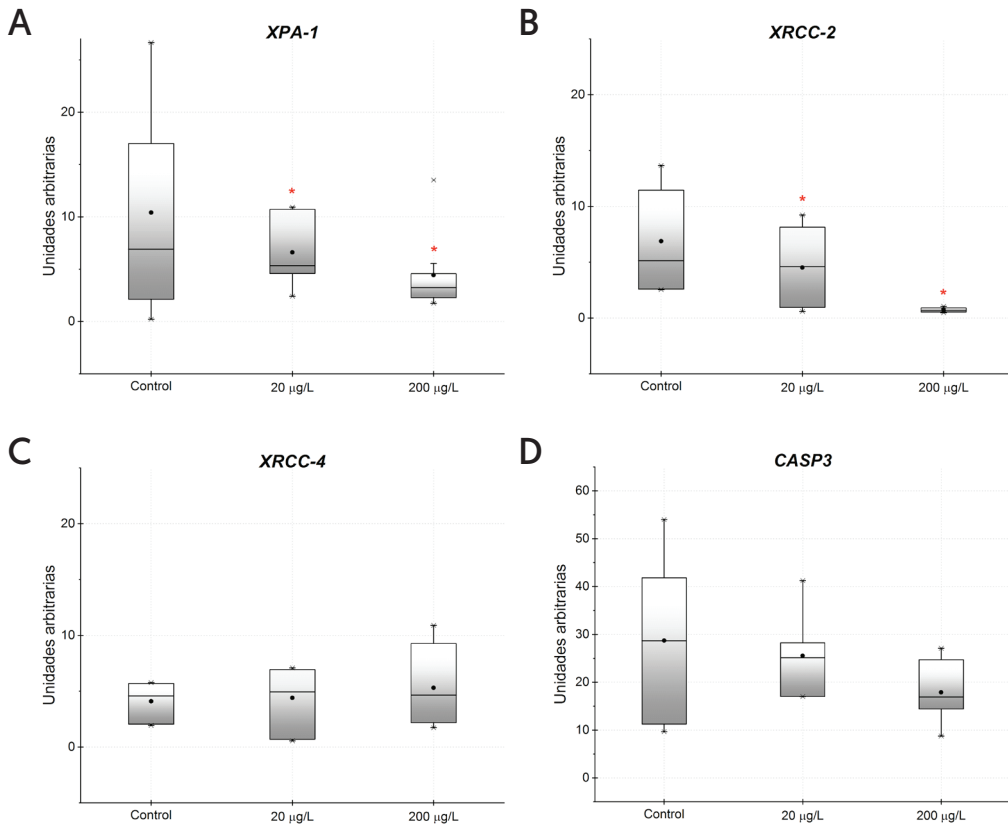


FIGURA 30. Efecto de la Vinclozolina sobre los genes *CASP3*, *XPA-1*, *XRCC-2* y *XRCC-4*, relacionados con el daño al ADN en *P. acuta*. Análisis de expresión del ARNm en adultos expuestos a 20 y 200 µg/L de Vinclozolina durante 24 horas. Las gráficas representan los valores medios de la expresión, donde la línea horizontal dentro del recuadro indica la mediana, los límites del recuadro indican los percentiles 25 y 75 y los bigotes representan los valores más altos y más bajos. La media está representada por un pequeño círculo dentro de la caja. El número de individuos para cada caja es siete ($n = 7$). Las diferencias se compararon utilizando Kruskal-Wallis, [* $p \leq 0.05$].

5.5. Efecto de la Vinclozolina en biomarcadores génicos polisomales

Al igual que lo descrito en el apartado 5.1, la alteración de la expresión génica se puede ver afectada por la acción de la Vz, al inducir e inhibir de forma diferencial ciertos genes. Aunque se produzca un cambio a nivel transcripcional, este no tiene necesariamente que implicar una producción de la proteína ya que se puede producir una alteración en la traducción. Para analizar esta posibilidad se utilizó el aislamiento de polisomas y posterior estudio con RT-PCR. El perfil polisómico permite el aislamiento de aquellos transcritos que se están traduciendo activamente.

5.5.1. Efecto de la Vinclozolina en biomarcadores génicos polisomales de *Chironomus riparius*

Con el fin de comparar las posibles alteraciones producidas y las diferencias causadas por la Vz a nivel de traducción, en este apartado los genes analizados fueron los mismos que los descritos en los apartados 5.1.2.1, 5.1.2.2 y 5.1.2.3. El análisis de la expresión se realizó exponiendo larvas del cuarto estadio de *C. riparius* a las mismas condiciones que las descritas en el apartado 5.1.2.

5.5.1.1 Efectos sobre el sistema endocrino

Los resultados obtenidos [Figura 31A], muestran como el gen *EcR* presenta unos niveles similares al control excepto a las 48 horas de exposición, donde se produce una inhibición a la concentración más alta evaluada [200 µg/L].

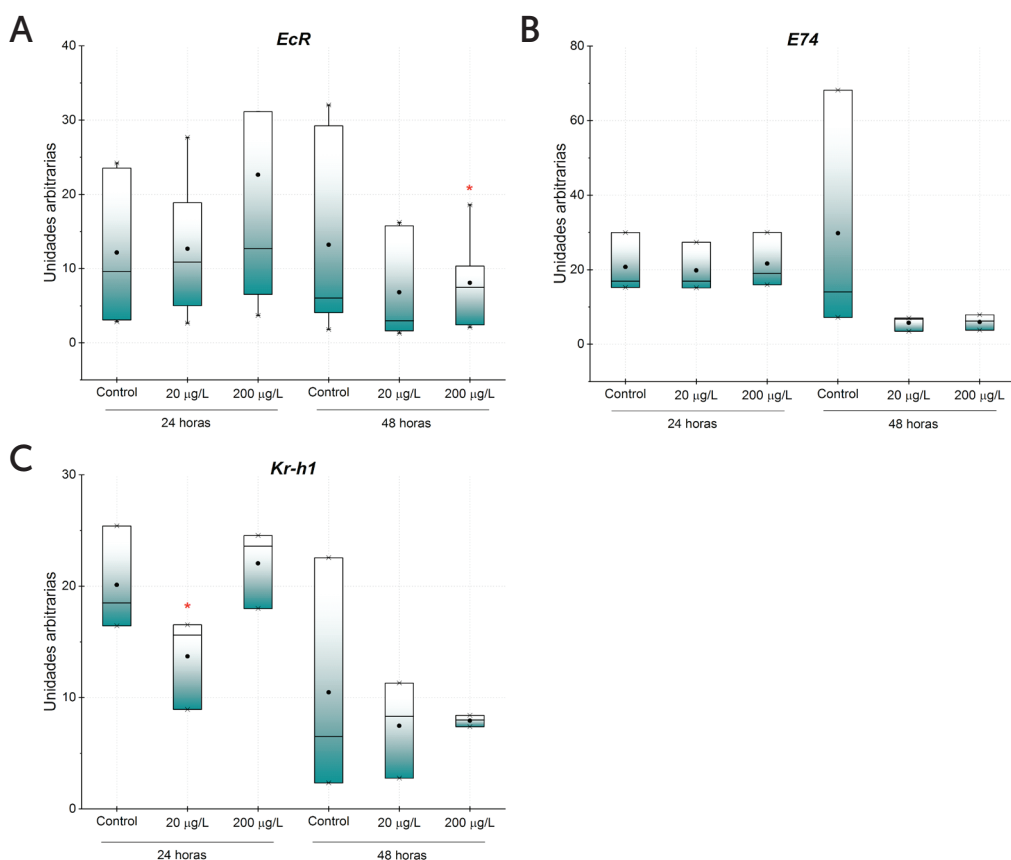


FIGURA 31. Efectos de la Vinclozolina sobre la expresión polisomal en *C. riparius* de los genes *EcR*, *E74* y *Kr-h1*, relacionados con el sistema endocrino. Análisis de larvas expuestas a 20 y 200 µg/L de Vz durante 24 y 48 horas. Las gráficas representan los valores medios de la expresión, donde la línea horizontal dentro del recuadro indica la mediana, los límites del recuadro indican los percentiles 25 y 75 y los bigotes representan los valores más altos y más bajos. La media está representada por un pequeño círculo dentro de la caja. El número de larvas para cada condición es siete ($n = 7$). Para los datos distribuidos normalmente, las diferencias significativas se compararon utilizando ANOVA, [$* p \leq 0.05$].

El *EcR* es el iniciador de un proceso en cascada que lleva a la activación de otros genes que codifican para factores de transcripción, entre los que se encuentran los genes *E74* y *Kr-h1*. El primero [*E74*] no presentó cambios en los ARNm asociados a los polisomas a ninguna de las concentraciones ni tiempos estudiados [Figura 31B]. Por otro lado, *Krh-1*, mostró un descenso a las 24 horas con la concentración más baja evaluada [20 $\mu\text{g/L}$] [Figura 31C].

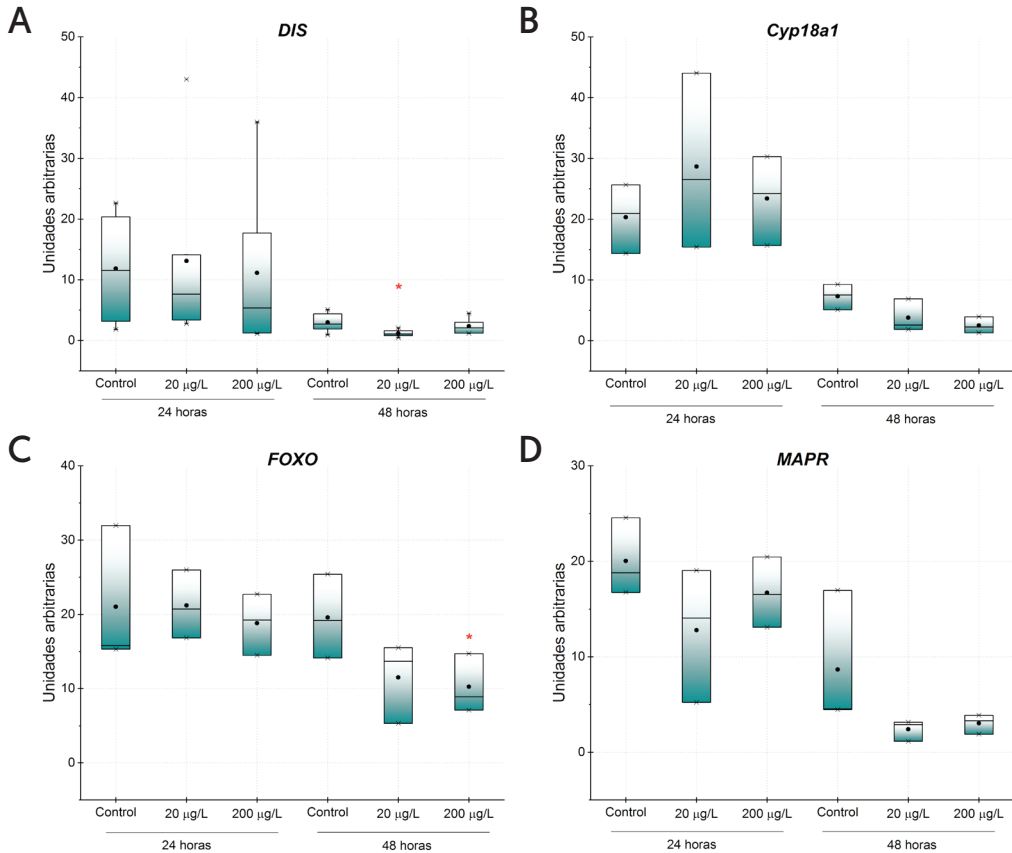


FIGURA 32. Efectos de la Vinclozolina sobre la expresión polisomal en *C. riparius* de los genes *DIS*, *Cyp18a1*, *FOXO* y *MAPR*, relacionados con el sistema endocrino. Análisis de larvas expuestas a 20 y 200 $\mu\text{g/L}$ de Vz durante 24 y 48 horas. Las gráficas representan los valores medios de la expresión, donde la línea horizontal dentro del recuadro indica la mediana, los límites del recuadro indican los percentiles 25 y 75 y los bigotes representan los valores más altos y más bajos. La media está representada por un pequeño círculo dentro de la caja. El número de larvas para cada condición es siete ($n = 7$). Para los datos distribuidos normalmente, las diferencias significativas se compararon utilizando ANOVA, [* $p \leq 0.05$].

Dos genes relacionados con el metabolismo de la ecdisona, *DIS* y *Cyp18a1*, mostraron un comportamiento diferente, ya que para el primero se detectó una disminución para la concentración de 20 $\mu\text{g/L}$ a las 24 horas [Figura 32A], mientras que en el segundo no se detectaron cambios a ninguna de las concentraciones ni de los tiempos analizados [Figura 32B].

El análisis de la traducción de genes relacionados con hormonas diferentes a la ecdisona únicamente mostró un efecto de inhibición para *FOXO* a las 48 h de tratamiento cuando las larvas son expuestas a 200 $\mu\text{g/L}$ [Figura 32C].

5.5.1.2. Efectos en la respuesta a estrés celular

El análisis polisomal en relación a la respuesta de estrés celular se analizó mediante la determinación de los niveles de ARNm asociados a polisomas de los genes *Hsp24*, *Hsp70* y *Gp93*. Mientras *Hsp24* y *Gp93* no mostraron cambios a ninguna de las concentraciones ni de los tiempos analizados [Figuras 33A y 33C], *Hsp70* presentó un descenso a las 24 horas de tratamiento para la concentración más baja evaluada [20 $\mu\text{g/L}$] [Figura 33B]. Estos datos sugieren que la Vz podría alterar la traducción de algunos ARNm involucrados en la respuesta de estrés celular.

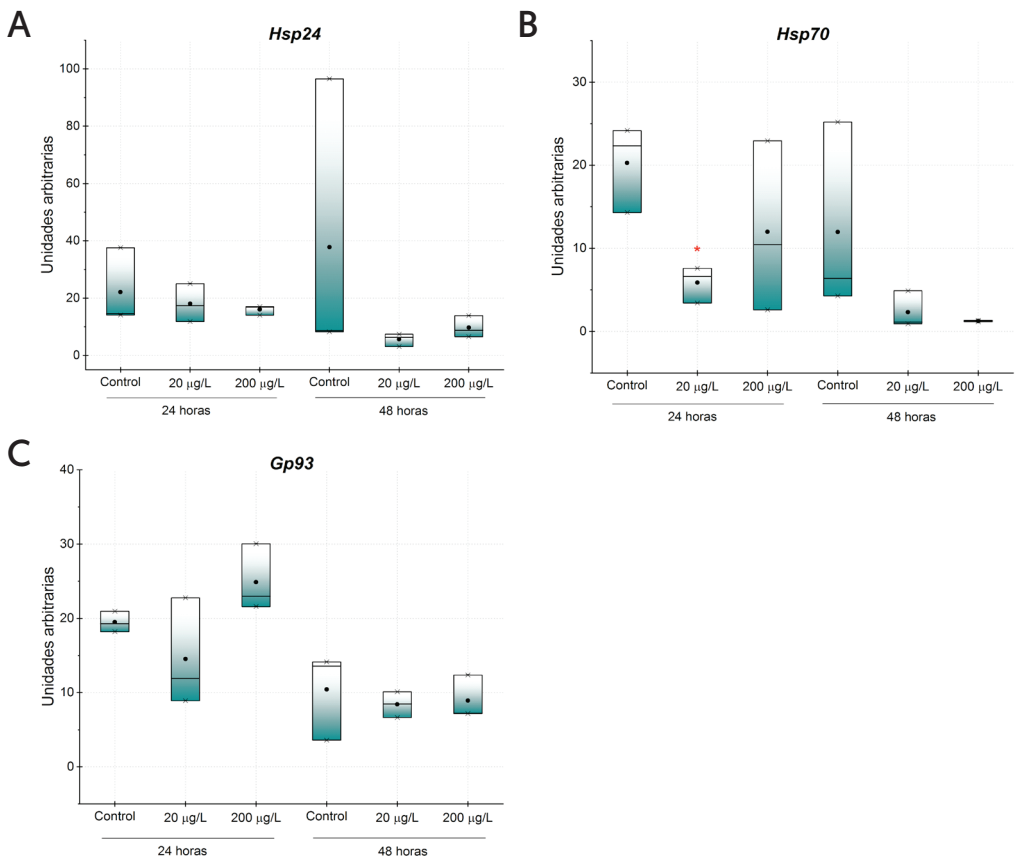


FIGURA 33. Efectos de la Vinclozolin sobre genes polisomales de *C. riparius* relacionados con la respuesta a estrés celular. Análisis de expresión del ARNm de los genes *Hsp24*, *Hsp70* y *Gp93* de larvas expuestas a 20 y 200 $\mu\text{g/L}$ de Vinclozolin durante 24 y 48 horas. Las gráficas representan los valores medios de la expresión, donde la línea horizontal dentro del recuadro indica la mediana, los límites del recuadro indican los percentiles 25 y 75 y los bigotes representan los valores más altos y más bajos. La media está representada por un pequeño círculo dentro de la caja. El número de larvas para cada condición es siete ($n = 7$). Las diferencias se compararon utilizando ANOVA, [$* p \leq 0.05$].

5.5.1.3. Efectos en la respuesta de detoxificación celular

La activación de la fase I [que implica la oxidación, reducción o hidrólisis de la sustancia por medio de enzimas pertenecientes a la superfamilia citocromo P450] y la fase II [que conlleva la conjugación con distintos compuestos polares por medio de transferasas] de detoxificación tras exposición a Vz, se estudió a través del análisis de los niveles de traducción del gen *Cyp4G*, perteneciente a la fase I, y del gen de la glutatión-S-transferasa delta 3 [*GstD3*], de la fase II.

Como se puede observar en la Figura 34A, *Cyp4G* disminuye su actividad tras 48 horas de exposición, pero solo para la concentración de 200 $\mu\text{g/L}$. Finalmente, el análisis de los niveles de ARNm del gen *GstD3* mostró niveles similares para ambos tiempos y concentraciones, sin ser significativos con respecto al control [Figura 34B]. Estos resultados sugieren que la Vz podría activar la fase I del sistema de detoxificación.

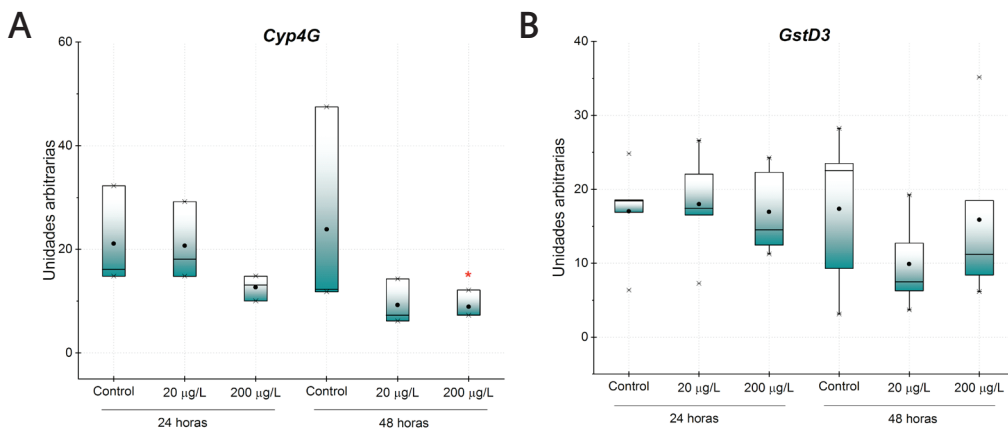


FIGURA 34. Efectos de la Vinclozolina sobre genes polisomales de *C. riparius* relacionados con el sistema de detoxificación celular. Análisis de expresión del ARNm de los genes *Cyp4G*, y *GstD3* de larvas expuestas a 20 y 200 $\mu\text{g/L}$ de Vinclozolina durante 24 y 48 horas. Las gráficas representan los valores medios de la expresión, donde la línea horizontal dentro del recuadro indica la mediana, los límites del recuadro indican los percentiles 25 y 75 y los bigotes representan los valores más altos y más bajos. La media está representada por un pequeño círculo dentro de la caja. El número de larvas para cada condición es siete ($n = 7$). Las diferencias se compararon utilizando ANOVA, [$* p \leq 0.05$].



6. Discusión

6.1 Ensayos ecotoxicológicos

El potencial tóxico de la Vz ha sido estudiado principalmente en vertebrados, actuando como un compuesto antiandrogénico [Kelce and Wilson, 1997], alterando el desarrollo tanto de los genitales externos como de las funciones mamarias [Flick et al., 2017; Hoffmann and Kloas, 2016; Jedeon et al., 2016]. Sin embargo, los mecanismos de acción a nivel molecular aún no se han caracterizado completamente.

Un primer paso en el estudio ecotoxicológico de cualquier sustancia es analizar su efecto sobre la supervivencia en el organismo modelo. De esta forma, se puede conocer la sensibilidad del individuo y seleccionar las concentraciones adecuadas para extender el estudio de sus efectos. Esto es importante cuando se quiere investigar el mecanismo de acción de un compuesto, ya que es necesario trabajar con concentraciones subletales de modo que los posibles efectos observados no se enmascaren con otros procesos inespecíficos propios de daños letales como por ejemplo la apoptosis. En la presente tesis doctoral se ha analizado la supervivencia en larvas de *C. riparius* y adultos de *P. acuta* y se ha podido observar que ninguna de las concentraciones estudiadas [20, 200, 500, 2000 y 5000 µg/L] produce efectos sobre la supervivencia tras exposiciones agudas. La baja toxicidad concuerda con resultados previos observados en invertebrados, donde exposiciones crónicas del gasterópodo de agua dulce *M. cornuarietis* y el prosobranquio marino *N. lapillus* a 0.03 y 1 µg/L de Vz, no produjeron efectos en la mortalidad, [Ducrot et al., 2010; Lemos et al., 2010a; Oehlmann et al., 2007]. Sin embargo, la exposición a un rango de concentraciones desde 0.5 a 5000 µg/L de individuos de *P. acuta* produjo efectos letales tras exposiciones crónicas de 45 días, aunque sólo la mayor concentración utilizada [5000 µg/L], que es muy superior a las halladas ambientalmente [Sánchez-Argüello et al., 2016].

Los resultados de la presente tesis doctoral muestran una dinámica de respuesta diferente en el caso de embriones de *C. riparius* con respecto a los observados en larvas, ya que el mismo rango de concentraciones produjo una reducción en el porcentaje de eclosión de dichos embriones. Esto resalta una mayor sensibilidad de embriones de *C. riparius* en relación a las larvas, por lo que la Vz produce efectos diferenciales en las distintas fases del ciclo de vida de esta especie. Este efecto de retrasar la eclosión de embriones de *C. riparius* se ha descrito previamente con otros compuestos como la benzofenona-3 [BP-3] o el octocrileno [OC] [Ozáez et al., 2016b, 2014]. No obstante, aquí se describe por primera vez este tipo de efecto de la Vz en *C. riparius*, por lo que se amplió el estudio toxicológico para conocer sus posibles consecuencias en el desarrollo y la reproducción.

Los efectos en el desarrollo y reproducción de *C. riparius* se evaluaron mediante exposición crónica a Vz a concentraciones en agua de 2, 20, 200 y 2000 µg/L. Dado que los efectos en el desarrollo pueden afectar al número de individuos que alcanzan la fase adulta, se analizó la tasa de desarrollo y la emergencia de mosquitos. Los datos obtenidos muestran una tendencia de la Vz a inducir cambios

en el desarrollo de *C. riparius*, ya que se observó un ligero aumento en la tasa de desarrollo para las dos concentraciones más altas [200 y 2000 µg/L] y un aumento en el ratio de emergencia para la concentración más baja evaluada. Por otro lado, la fecundidad, medida como el número promedio de huevos producidos por hembra, también mostró una tendencia de inducción progresiva, aunque estadísticamente no significativa con el aumento de concentración de Vz. Este efecto ha podido observarse con compuestos con mecanismos de acción diferente a la Vz como los xenoestrógenos, Bisfenol A y el nonifenol, que son capaces de producir una estimulación en la producción de embriones en *Potamopyrgus antipodarum* [Duft et al., 2003] the xeno-estrogens bisphenol A [BPA, o en *Acartia tonsa* [Andersen et al., 1999]. Así mismo, dicho incremento en la fecundidad también se ha descrito en otras especies como *L. stagnalis*, donde exposiciones crónicas a 0.286 µg/L de Vz, estimulan la fecundidad [Baatrup and Junge, 2001]. Los autores asociaron el aumento de fecundidad a la actividad antiandrogénica de la Vz [Baatrup and Junge, 2001]. Esos resultados refuerzan la hipótesis de que la Vz probablemente induce cambios en la función masculina, como ya se ha demostrado en estudios con peces [Baatrup and Junge, 2001; Bayley et al., 2003; Kiparissis et al., 2003]. Los mecanismos subyacentes en *C. riparius* son difíciles de justificar de acuerdo a lo anterior ya que no se ha detectado la presencia de andrógenos en esta especie. Independientemente de los mecanismos asociados, el aumento del potencial reproductivo se explica como una reacción de estrés para contrarrestar el riesgo de extinción en ambientes contaminados [Ristola et al., 2001; Vogt et al., 2007]. No obstante, aunque pueda considerarse como una respuesta beneficiosa para la población, existen efectos adversos asociados como los observados en peces, con daños en el sistema reproductor de las hembras por sobreproducción de huevos, o aquellos asociados a condiciones ambientales no favorables para sostener un aumento considerable de la progenie [Fong et al., 1998; Sánchez-Argüello et al., 2009].

Existen en la literatura trabajos que describen efectos transgeneracionales para la Vz mediados por mecanismos epigenéticos [Babica et al., 2016; Beck et al., 2017; Paoloni-Giacobino, 2014; Schuster et al., 2016; Skinner and Anway, 2007]. Estos podrían relacionarse en la presente tesis con el mayor efecto embriotóxico observado en las puestas de parentales que se desarrollaron en un ambiente con Vz. El efecto era máximo a la concentración de 200 µg/L, con la total inhibición de la eclosión de los embriones. Solo existe un estudio previo analizando este tipo de respuesta con Vz, realizado en *P. acuta*, y en el mismo se observó que los embriones con progenitores expuestos mostraban esta tendencia a la disminución del porcentaje de embriones que llegaban a eclosionar si bien no se observaban efectos en la fertilidad [Sánchez-Argüello et al., 2016]. La tendencia observada en esta tesis en relación con la fecundidad y embriotoxicidad de la generación filial de parentales expuestos en *C. riparius* concuerda con los hallazgos anteriores en otras especies sobre los efectos de disrupción endocrina y posibles efectos transgeneracionales de la Vz. Sin embargo no se pueden descartar otras causas que provoquen el aumento de la embriotoxicidad de la generación filial como son procesos tóxicos inespecíficos que afecten a la viabilidad del embrión y no asociados a mecanismos epigenéticos.

6.2. Efectos en la expresión génica

Los contaminantes pueden producir una respuesta temprana a nivel molecular de tal forma que puede desencadenar efectos en cascada observables a distintos niveles de complejidad biológica. De esta forma, analizando procesos moleculares y celulares se pueden obtener indicios que permitan dilucidar los posibles mecanismos de acción capaces de producir efectos observables mediante test ecotoxicológicos.

En los últimos años, multitud de trabajos científicos han puesto de manifiesto la necesidad del empleo de herramientas celulares y moleculares dentro del campo de la Ecotoxicología [Walker and McEldowney, 2013; Kim et al., 2015; Zhang et al., 2018]. Si bien en el pasado estas metodologías habían sido vistas con escepticismo por su incapacidad de predecir efectos ecológicamente relevantes, la combinación de metodologías moleculares y la valoración de respuestas extrapolables a efectos poblacionales constituyen un nuevo marco de trabajo en los procesos de evaluación del riesgo ambiental [Ankley et al., 2010]. Con esta idea, y para mejorar el conocimiento del efecto de la Vz a nivel celular y molecular en invertebrados, se abordó el estudio de diversas rutas celulares analizando la expresión de genes implicados en las mismas. En el metabolismo celular existen múltiples rutas que pueden tener relevancia en la toxicidad, por ello en la presente tesis se han seleccionado aquellas que se consideran que presentan una especial relevancia en la regulación de los procesos fisiológicos [rutas endocrinas] o conforman la respuesta más inmediata de la célula a la presencia de un tóxico [estrés celular y mecanismos de detoxificación].

Genes de rutas endocrinas

Los EDC pueden mimetizar a estrógenos y andrógenos a través de unión a receptores hormonales o interferir en las rutas de señalización celular, alterando la producción y eliminación de las hormonas naturales, o modificar su unión a receptores a nivel funcional [Barouki, 2017]. Estos efectos pueden ocurrir inmediatamente tras la exposición a la sustancia o tras su metabolización, de ahí la importancia de estudiar si la respuesta se mantiene en el tiempo o, en cambio, se acentúa o atenúa. En este estudio se han analizado los efectos de la Vz en dos invertebrados acuáticos que presentan sistemas endocrinos distintos. Mientras que el sistema endocrino de moluscos es poco conocido, los insectos han sido estudiados en mayor profundidad y hay más información sobre su sistema endocrino. Por otro lado, se ha demostrado la interacción de la Vz con el sistema endocrino tanto en mamíferos como en peces, a través de la estimulación de la producción de andrógenos en los órganos sexuales masculinos, alterando los niveles de ARNm del receptor de andrógenos. Golshan y colaboradores [2016] demostraron que la Vz era capaz de alterar la biosíntesis de andrógenos en el pez *Carassius auratus*, aumentando los niveles de ARNm de los genes *kiss-2* [un péptido neuroendocrino que regula la reproducción en vertebrados] y *gnrh3* [encargado de estimular el eje reproductivo en ciertas especies de peces]. Así mismo el estudio de la Vz en *Oryzias latipes* también demostró la capacidad de este compuesto para alterar la expresión de genes relacionados con el sistema endocrino como el receptor de estrógenos [ER], el receptor de andrógenos [AR] o la vitelogenina [Sun et al., 2016].

En el caso de insectos no se han detectado ni estrógenos ni andrógenos pero una de las hormonas más importantes es la ecdisona, de naturaleza esteroidea y con un receptor nuclear de la familia del *ER* [el *EcR*].

Al jugar un papel central en el proceso de la muda y el desarrollo, estudiar los efectos que pueda tener la Vz en la ruta de respuesta o en el metabolismo de la ecdisona aporta información sobre posibles mecanismos que podrían relacionarse con los efectos observados en embriones y en el desarrollo. En larvas de *C. riparius* se produce un aumento de los niveles de transcripción del *EcR* y, 24h más tarde, un incremento en dos genes que se encuentran en fases posteriores de la ruta de respuesta a ecdisona [*E74* y *Kr-h1*]. Esta activación secuencial sugiere que la Vz se comporta de manera similar a la ecdisona y, por tanto, que es capaz de afectar a esta vía endocrina de insectos mimetizando su activación. Cuando se analizan los resultados obtenidos en el estudio de la actividad polisomal, llama la atención que hay una disminución en la traducción del ARNm del *EcR* y del *Kr-h1* y no un aumento en la traducción de ARNm como sería esperable por el aumento de la transcripción. Esta falta de sincronización en los resultados puede sugerir varios escenarios. Una posibilidad es que la Vz también afecte a la síntesis de las proteínas de una forma no relacionada con la respuesta a ecdisona, algo que también se observaría con otros genes analizados. Otra posibilidad sería que el aumento del ARNm no se traduzca en un incremento en los ARNm que se traducen de forma simultánea existiendo algún tipo de regulación postranscripcional. En cualquier caso hay que tener en consideración que el aumento de la actividad transcripcional no supone, de acuerdo con la actividad de los polisomas, un aumento de las proteínas.

No existen estudios previos sobre los efectos en el metabolismo de las hormonas de compuestos con acción antiandrogénica asociada a la unión con el receptor de andrógenos [Kavlock and Cummings, 2005], por ello el aumento de la expresión de *Cyp18a1* observado en este trabajo es la primera evidencia de la posible interferencia de Vz en el metabolismo hormonal de insectos. Este resultado sugiere que la Vz podría afectar al sistema endocrino de insectos de muy diversas maneras, como la relacionada con el citocromo P450 [Oca et al., 2015; Ronis et al., 1998], y que puede indicar un aumento de la degradación de la hormona. En este sentido, el resultado obtenido en el estudio de los polisomas asociados a *DIS*, implicado en la síntesis de ecdisona sugiere que hay un descenso en los polisomas que traducen este gen. Esto, a falta de confirmar si es un efecto específico o más general, sugiere un descenso en la producción de la proteína que, quizá, esté reflejando la reducción de la síntesis al mismo tiempo que se aumenta la degradación. Por lo tanto, la Vz junto con ejercer un efecto mimetizante de la ecdisona estaría alterando también su metabolismo.

Otro indicio de la posible interferencia de la Vz en rutas hormonales pudo observarse en la activación del gen *FOXO* asociado a la respuesta al péptido equivalente a la insulina en insectos. En este sentido, se ha descrito la relación de *FOXO* como factor de transcripción en la vía de señalización de la insulina. Además, estudios previos con el lepidóptero *Bombyx mori*, han demostrado su papel en la regulación de la HJ y modulando el crecimiento y el desarrollo [Zeng et al., 2017], lo que hace de este gen un nexo de unión entre distintas rutas endocrinas. En este

caso el resultado fue similar al del *EcR*, con un aumento de la transcripción pero que se traduce en un descenso en la unión de polisomas. Por tanto, es necesario también considerar la posibilidad de que la Vz esté afectando a la vía de la insulina pero sin descartar que existan otros mecanismos que expliquen el aumento en la actividad de transcripción pero no en la de traducción. Análisis adicionales a tiempos más largos e incluyendo genes no implicados en la respuesta endocrina permitirían obtener información adicional para determinar si es un fenómeno específico de la acción de la Vz sobre el sistema endocrino o, por el contrario, está más relacionado con un efecto general en la célula que afecta a la traducción.

En conjunto se puede concluir que la Vz produce un efecto en el sistema endocrino a nivel de regulación génica alterando la expresión de *EcR* y, al mismo tiempo, modificando el metabolismo de la ecdisona. Cabe mencionar que la concentración más baja evaluada [20 µg/L] presenta alteraciones en los niveles de expresión de muchos genes, que no se observan con la concentración más alta. Esto sugiere una respuesta conocida como U invertida, observada con diferentes xenoestrógenos que ocurre cuando concentraciones más bajas producen respuestas más relevantes [Murnyak et al., 2011; Welshons et al., 2003], aunque dicho tipo de respuesta no puede ser confirmada en este caso ya que la concentración de 200 µg/L podría provocar una respuesta más temprana incluso antes de las 24 h, no estudiada en este trabajo, además de ser necesario trabajar con un rango más amplio de concentraciones.

Durante la embriogénesis tiene lugar la diferenciación celular, proceso muy dependiente de las modificaciones en la expresión génica. Es por tanto esperable que la acción de los disruptores endocrinos en embriones sea especialmente detectable a nivel molecular. Como se ha visto, la Vz produce una activación de *EcR* y *E74* en larvas de *C. riparius*. Este mismo efecto se da en embriones de *C. riparius* a las 8h con la concentración más baja estudiada. Esto sugiere que la Vz tiene un efecto similar en embriones, aunque una de las principales diferencias observadas en este caso fue que ambos genes muestran una represión con la concentración más alta evaluada en tiempos más tardíos que no se observó en larvas. El significado biológico de los cambios no está claro ya que no se ha descrito el papel de la ecdisona en la progresión de los embriones de *C. riparius*. Además, la fuerte inhibición detectada para la concentración más alta puede ser consecuencia de una fuerte activación transitoria previa que, similar a lo que ocurre con otros genes, sigue una dinámica de onda con una subida y un posterior descenso por debajo de los niveles habituales para recuperar posteriormente la situación control. En conjunto estos resultados constituyen la primera evidencia en insectos de la capacidad disruptora endocrina de la Vz a nivel molecular en embriones.

El gen *MAPR* codifica para un receptor huérfano poco conocido en invertebrados. No obstante sus similitudes con otros receptores de esteroides sugieren que podría verse afectado por EDC. El efecto de la Vz sobre su actividad en larvas de *C. riparius* parece ser nulo, ya que no se detectaron cambios significativos a ninguno de los niveles analizados [transcripcional o traduccional]. Sin embargo, en embriones de *C. riparius* mostró una dinámica similar a la observada con el *EcR* y el *E74*. Estos resultados coinciden con un estudio previo realizado en *C. riparius* con dos filtros ultravioleta, el 4-metilbenzil alcanfor [4MBC] y la benzofenona-3 [BP3]. En este estudio

no se observaron cambios en larvas pero sí se detectó un aumento de la expresión de ARNm de *MAPR* a las 8 h de exposición [Ozáez et al., 2016a]. El significado biológico de estos resultados es incierto ya que el hecho de que *MAPR* se vea afectado en embriones sugiere una posible función de este gen en el desarrollo embrionario. Sin embargo, no existe nada descrito en la bibliografía en este sentido, por lo que se trata de la primera vez que se evidencia la posibilidad de su papel en el desarrollo. Por otro lado, es interesante este efecto diferencial entre larvas y embriones ya que sugieren que este gen es un buen indicador en el desarrollo embrionario y merece un estudio más a fondo.

Además de la respuesta asociada a la ruta de la ecdisoma y el gen *MAPR*, también se han detectado cambios dependientes del tiempo y concentración de exposición en embriones de *C. riparius* de otros genes implicados en otras rutas endocrinas. Es el caso de *MET*, postulado como receptor de HJ [Charles et al., 2011; Jindra et al., 2013], e *INR*, relacionado con la ruta de péptidos similares a la insulina que regulan el almacenamiento de lípidos y carbohidratos [Jindra et al., 2013]. Además, en el caso de *INR* es importante destacar que en los últimos años se ha demostrado su implicación en otros procesos como la respuesta al estrés [Gruntenko and Rauschenbach, 2018]. En este sentido, la sobreexpresión de *MET*, junto con la tendencia de aumento para la concentración más alta para ambos tiempos de exposición observada para *INR*, pueden estar indicando que el control de la resistencia al estrés a través de esta ruta de señalización se ve alterado. Se ha demostrado que el estrés mitocondrial del desarrollo desencadena la activación de *FOXO* a través de dos quinasas [ASK1 y JNK]. La represión de la señalización de insulina por la quinasa JNK, sensible al estrés, se postula como un mecanismo conservado que permite la reasignación de recursos de anabólicos bajo condiciones de estrés [Karpac et al., 2009]. Por tanto, la sobreexpresión transcripcional observada y la fuerte represión traduccional de *FOXO* sugieren que la Vz es capaz de desencadenar distintos procesos interrelacionados como son factores de crecimiento y respuesta a estrés celular en distintas fases del desarrollo de *C. riparius*.

El sistema endocrino de moluscos se encuentra poco caracterizado y es relativamente desconocido en comparación con el de vertebrados, a pesar de que se ha descrito la presencia de diversas hormonas esteroideas sexuales similares a las de vertebrados en este grupo taxonómico. Sin embargo, la función de los esteroideos sigue siendo desconocida aunque se ha propuesto su participación en la reproducción [Zheng et al., 2014]. A menudo los estudios se han centrado en el análisis de la presencia de andrógenos y otros esteroideos sexuales, pero todavía hay un debate sobre su papel biológico [Scott, 2013, 2012]. El principal obstáculo para considerar que estos compuestos tienen origen endógeno es que no se ha podido identificar la aromatasas, la enzima responsable del paso final en la síntesis de esteroideos sexuales [Scott, 2018]. Sin embargo, sí se han identificado genes que codifican para receptores de estrógenos, como en el caso de *P. acuta* [Martínez-Paz et al., 2017]. Los estudios previos sobre los efectos de la Vz en la expresión de *ER* en mamíferos tanto *in vitro* como *in vivo* son controvertidos, ya que se ha observado una no alteración de la expresión del receptor [*in vitro*], una sobreexpresión del receptor [machos *in vivo*] e incluso una disminución de la expresión [hembras *in vivo*] [Kojima et al., 2004; Buckley et al., 2006]. Los resultados con adultos de

P. acuta no mostraron la activación de la expresión del *ER* en esta especie tras exposición a Vz. La escasa caracterización del sistema endocrino de *P. acuta* a nivel molecular no ha permitido estudiar de forma efectiva los efectos de la Vz en esta especie, si bien es interesante continuar trabajando en esta línea, ya que al tratarse de una especie hermafrodita podrían encontrarse efectos no observables en especies con sexos separados.

Genes de estrés y detoxificación.

La respuesta celular frente a estrés tiene como principal objetivo minimizar cualquier daño fisiológico inducido por un agente químico o físico. Frente a un estímulo ambiental, las células desencadenan distintos procesos, entre los que se encuentran aquellos en los que intervienen las proteínas de choque térmico (HSP), que resultan esenciales para la supervivencia celular a través de su función como proteínas chaperonas. La relevancia de su papel en el estrés se pone de manifiesto porque son las proteínas más primitivas y conservadas evolutivamente [Sreedharan and Van Why, 2016]. Por todo ello, las HSP se consideran buenos biomarcadores y particularmente los estudios se centran en la Hsp70, si bien en esta tesis se han analizado HSP de otras familias puesto que, tomadas como un conjunto, pueden mostrar una respuesta específica según el tóxico [Martín-Folgar et al., 2018; Martín-Folgar and Martínez-Guitarte, 2017]. Entre las familias estudiadas se incluyen la de las HSP de pequeño tamaño, la HSP70 y la HSP90.

El conocimiento del efecto de la Vz en el estrés celular a nivel de expresión génica es escaso en invertebrados, no existiendo información previa ni en *C. riparius* ni en *P. acuta*. Los únicos estudios presentes en la bibliografía se han realizado en dos crustáceos, el isópodo *Porcellio scaber* y el anfípodo *Hyalella*. Estos estudios describen la activación de *Hsp70* y otros genes relacionados con estrés y la hemocianina en presencia de la Vz [Lemos et al., 2010b; Wu et al., 2014]. Sin embargo, el análisis de la alteración de los genes de estrés en larvas de *C. riparius* sí se ha realizado con otros compuestos químicos como el cobre y la Azadiractina, produciendo un aumento en la expresión de los genes *Hsp10*, *Hsp40* y *Hsp70* [Lencioni et al., 2016]. Sin embargo, la exposición a filtros ultravioleta como el BP3 y el 4MBC no indujo cambios en la expresión de *Hsp24* y *Hsp60*, aunque sí en la actividad transcripcional de *Hsp21*, *Hsp22* y *Hsp27*. Los resultados obtenidos en esta tesis muestran para larvas de *C. riparius* un aumento a las 48 horas de *Hsp24* y *Hsp70* que, sorprendentemente, no parece traducirse en un aumento de proteína ya que los resultados con polisomas muestran una disminución en la traducción del ARNm de *Hsp70* a las 24 h. Esto sugiere que el aumento en los niveles de ARNm no se transformaría en un aumento de la proteína al no traducirse. En conjunto, y particularmente para la Hsp70, parece existir algún tipo de regulación postranscripcional que afecta a la traducción de los nuevos ARNm generados. Por otro lado, los cambios observados para *Gp93*, gen que se relaciona con el estrés pero también con el sistema inmune, podrían estar reflejando una posible interferencia de la Vz con el sistema inmune. No obstante, sería necesario el análisis de otros genes relacionado con dicho sistema antes de poder definir si las alteraciones en la expresión de este gen podrían afectar a la capacidad de la larva para defenderse de posibles patógenos.

Los resultados obtenidos con embriones de *C. riparius* son novedosos dado que esta aproximación ha sido poco utilizada. Mientras que la actividad transcripcional de *Hsp70* ha sido analizada en embriones de *C. riparius* expuestos a distintos filtros ultravioleta, observándose un incremento de los niveles con algunos de ellos [Ozáez et al., 2016b, 2014], el estudio de *Hsp40* no tiene precedente en esta fase de desarrollo. El estudio con embriones muestra así que son útiles a la hora de analizar los efectos de los tóxicos, especialmente por la importancia del desarrollo embrionario en el devenir del individuo y de la población. Por su parte, los resultados obtenidos con *Hsp60* concuerdan con lo observado en larvas de *C. riparius* tratadas con filtros UV y otros pesticidas [Lencioni et al., 2016; Ozáez et al., 2016b] y sugieren también que hay un efecto a nivel de la mitocondria, ya que la *Hsp60* y su cochaperona la *Hsp10* se localizan en este orgánulo [Nakamura and Minegishi, 2013]. En conjunto se puede decir que el incremento de la actividad de *Hsp70* y *Hsp40* refleja, probablemente, un papel de respuesta a estrés ya que la *Hsp70* requiere de la ayuda de la *Hsp40* para realizar su papel en la respuesta de estrés celular. Queda por determinar si este aumento se debe a un efecto de desnaturalización de las propias proteínas o, sin embargo, sea un proceso que tenga que ver con el efecto de la Vz sobre el sistema endocrino. La *Hsp70* y la *Hsp90* son proteínas que intervienen en el proceso de maduración de receptores nucleares [Eckl and Richter, 2013; Mayer and Bukau, 2005] y, por tanto, pueden verse involucradas en distintos procesos. Por último, el incremento de *Hsp60* invita a pensar en un posible daño mitocondrial en el embrión, pero se necesita más información para poder definir el alcance del mismo y si puede afectar el desarrollo embrionario.

Si bien en *C. riparius* [larvas y embriones] existía una regulación positiva para las proteínas de pequeño tamaño, en adultos de *P. acuta* se detectó una reducción de la actividad transcripcional de los genes *Hsp16.6*, *Hsp17* y *Hsp20.4*, aunque solo para este último fue estadísticamente significativa. A diferencia de *C. riparius*, para *P. acuta* se analizó también la actividad del gen SOD-CuZn, que codifica para una superóxido dismutasa. Esta enzima está relacionada con la respuesta al estrés oxidativo, por lo que aparentemente no hay un efecto de la Vz que implique estrés oxidativo. Por el contrario, estudios previos en linfocitos humanos y bovinos expuestos a Vz, sí mostraron la inducción de enzimas relacionadas con estrés oxidativo [Lioi et al., 1998; Radice et al., 1998]. Los resultados de los genes HSP sugieren una menor sensibilidad con respecto a las larvas y embriones de *C. riparius* en la respuesta a estrés pero el descenso observado con *Hsp20.4* puede indicar que es un inicio de respuesta. Ensayos a tiempos más largos pueden dilucidar si esta es la situación.

Aunque en vertebrados los procesos de destoxicación han sido poco estudiados en relación a la Vz, sí se han observado patrones de inducción, inhibición y supresión de Cyp450s [Hrelia et al., 1996; Ronis et al., 1994, 1998], describiéndose que la Vz es capaz de alterar las enzimas del citocromo P450 [Oca et al., 2015]. En ratones se ha demostrado que la Vz induce las enzimas Cyp y la actividad GST [Cantelli-Forti and Camerino, 1998], lo que sugiere que el proceso de biotransformación de la Vz incluye la conjugación con el glutatión. Cuando se vuelve la vista a los invertebrados, se constata que el número de estudios es mucho menor pero sí se ha observado que puede alterar la regulación de algunos genes como el de la hemocianina, el de la citocromo c oxidasa o el del citocromo b [Wu et al., 2014]. Para

la Vz no existen datos previos en *C. riparius* por lo que se trata del primer estudio que analiza este aspecto celular. Para larvas de *C. riparius*, se seleccionaron genes de la fase I y fase II [*Cyp4G* y *GstD3*] observándose que se producía una activación de ambas en presencia de Vz. Los resultados sugieren una activación temprana de los mecanismos de detoxificación por presencia de la Vz que no se mantiene en el tiempo. La razón de esto puede ser que la célula actúa de forma efectiva sobre el compuesto y permite al individuo soportar las concentraciones utilizadas sin ver alterado de forma relevante el metabolismo celular. Hay que tener en cuenta que se trata de un estudio agudo, por lo que es una respuesta inmediata ante la presencia del contaminante. Esto supone que una vez aclimatado el organismo a la concentración presente puede volver a una situación control ya que no hay un riesgo inmediato para su supervivencia. Por otro lado, los resultados obtenidos también ponen de manifiesto que la familia de los citocromos y la familia de las GST son enzimas que intervienen en la biotransformación de este compuesto. Esto no descarta, sin embargo, la posibilidad de que existan otras enzimas de fase I implicadas, como esterasas o hidrolasas, o que se realice una conjugación con otros compuestos u otra transformación en fase II. Por tanto, es preciso realizar análisis adicionales ampliando el espectro de posibles enzimas que participan para definir así el proceso que puede estar teniendo lugar durante la biotransformación de la Vz.

Por otro lado, también se analizó la activación de los mecanismos de detoxificación en adultos de *P. acuta*. Con este organismo se realizó el estudio con genes que codifican enzimas involucradas en la fase I [*Cyp2U1*, *CYP3A7*, *CYP4F22*], la fase II [*GSTt2*, *GSTO*] y la fase III [*Mrp1-ABC*] de la biotransformación. En ningún caso se detectó una activación de la transcripción en comparación con el control. Esto sugiere que ninguna de las fases analizadas vio alterado su funcionamiento, a diferencia de lo que se observó con *C. riparius*. Este resultado puede deberse a que *P. acuta* tiene una menor sensibilidad a Vz y requiere de mayores concentraciones o tiempos de exposición más largos. No se puede descartar, sin embargo, que en este organismo estén implicadas en la biotransformación otras enzimas por lo que se requieren más estudios para determinar qué está ocurriendo. En cualquier caso, tanto los resultados con los genes de proteínas de estrés como los de detoxificación muestran distinta sensibilidad a la Vz entre *C. riparius* y *P. acuta*, lo que puede estar reflejando también diferencias fisiológicas específicas para contrarrestar los efectos de la Vz.

Efectos genotóxicos

Hasta la fecha los estudios de toxicidad de disruptores endocrinos se han centrado en la alteración que estos producen en rutas hormonales, obviando en la mayor parte sus efectos genotóxicos. Sin embargo, algunos autores apuntan a una relación entre los mecanismos de disrupción endocrina con procesos cancerígenos [Hagger et al., 2002]. Aunque Kevekorde et al., [1996] clasificaron a la Vz como compuesto no genotóxico, estudios posteriores con linfocitos de mamíferos demostraron una inducción de forma dependiente de la dosis de Vz de aberraciones cromosómicas estructurales, intercambios de cromátidas hermanas y modificaciones del índice mitótico [Lioi et al., 1998]. Por otro lado, la Vz produjo un pronunciado efecto co-mutagénico en presencia de benzo[a]pireno potenciando la inducción de

micronúcleos en líneas celulares humanas [Wu et al., 2005]. Asimismo, se ha descrito la inducción de micronúcleos en invertebrados acuáticos por exposiciones a Vz en el rotífero *Brachionus calyciflorus* [Zavala-Aguirre et al., 2007] y en embriones y adultos de *P. acuta* [Sánchez-Argüello et al., 2012; Sánchez-Argüello et al., 2016]. En esta tesis se ha estudiado la genotoxicidad de la Vz utilizando el ensayo cometa. Los ensayos de citogenotoxicidad previamente utilizados en el caso de la Vz [aberraciones cromosómicas, inducción de micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas], detectan daños en el ADN que aparecen tras una división celular, cuando los mecanismos de reparación celular han tenido lugar. En el caso del ensayo cometa es posible detectar daños en el ADN [roturas de hebra] previos a la división celular, y que podrían desaparecer mediante mecanismos de reparación del ADN. Por ello, y teniendo en cuenta la información contradictoria sobre la genotoxicidad de la Vz, se combinaron el ensayo cometa y el análisis de la activación de genes involucrados en procesos de reparación del ADN para dilucidar el proceso y la capacidad de reparación en cada organismo.

El análisis del potencial genotóxico de la Vz, en larvas de *C. riparius* confirma los resultados obtenidos en otros estudios, demostrando que la Vz produce daño en el ADN, incluso después de cortos tiempos de exposición. Las condiciones de electroforesis alcalina en las que se realizó el ensayo cometa permiten detectar roturas de doble hebra [DSB], por lo que los resultados muestran un efecto genotóxico de la Vz en *C. riparius* por DSB, daño que puede ser reparado por activación de los mecanismos de reparación.

El análisis del gen *ATM* que codifica para una proteína que media la respuesta a DSB [Guleria and Chandna, 2016; IJIMA et al., 2008], mostró un aumento en su actividad, lo que corrobora su participación en respuesta a las roturas producidas por el compuesto. Además, el aumento de otro de los genes estudiados, *XRCC-1*, sugiere que también pueden estar produciéndose rupturas de una sola hebra [SSB]. Por lo tanto, los resultados de expresión génica indican que la Vz estaría activando genes de reparación de DSB y de SSB. Es destacable cómo la respuesta de ambos genes de reparación de hebras de ADN es inversamente proporcional a la concentración de Vz. La concentración más baja [20 µg/L] activa la respuesta, mientras que la concentración más alta [200 µg/L] produce una inhibición de los genes relacionados con la reparación de roturas de hebras del ADN. Esto último se relaciona con un mayor daño en todos los parámetros analizados en el ensayo cometa, por lo que puede concluirse que, mientras la primera concentración activa los genes responsables de la reparación del daño, la segunda produce una inhibición que se traduce en un mayor daño genotóxico. Por otro lado, el análisis de la actividad del gen *NLK*, necesario para la activación de p53 en respuesta al daño del ADN [Zhang et al., 2014] indica que se inhibe. Esto puede estar reflejando que las vías relacionadas con p53 se están viendo afectadas en respuesta al daño de ADN, deteniendo el ciclo celular en caso necesario. Sin embargo, la respuesta similar al control observada con *DECAY*, un gen que codifica para una caspasa efectora, indicaría una no activación de la apoptosis. La represión de *NLK* podría estar por tanto relacionada con otras vías reguladas por esta proteína, ya que también participa en otros procesos como la proliferación y diferenciación celular y cambios morfológicos durante la embriogénesis temprana [Ishitani and Ishitani, 2013].

Estudios con plata, etilbenceno, o el cloruro de cadmio han demostrado que estos compuestos son capaces de inducir mecanismos de daño al ADN y apoptosis en gasterópodos como *Lymnea luteola*, *Bellamya aeruginosa* o *Nerita chamaeleon* [Ali, 2014; Sarkar et al., 2015; Zheng et al., 2013]. Se han descrito los efectos genotóxicos de la Vz con anterioridad en *P. acuta* tanto en embriones [Sánchez-Argüello et al., 2012] como en adultos [Sánchez-Argüello et al., 2016], donde se comprobó que dicho compuesto es capaz de inducir micronúcleos a 500 µg/L para adultos y 5000 µg/L para embriones. El análisis de la actividad genotóxica de la Vz utilizando el ensayo cometa con adultos de *P. acuta* mostró una respuesta dosis dependiente aunque sin observarse significación estadística a concentraciones menores [20 y 200 µg/L].

La capacidad de activar mecanismos de reparación del ADN también se evaluó en el caso de *P. acuta* mediante análisis de la expresión génica de distintos genes involucrados en dichos mecanismos. Dos genes previamente analizados en *C. riparius* fueron estudiados también en *P. acuta*, *ATM* y *XRRC-2*, mostrando una respuesta de inhibición para ambas concentraciones. Esto sugiere que los mecanismos de reparación de DSB y SSB en *P. acuta* no solo no se están activando, sino que están siendo inhibidos. Por otro lado, el gen *XPA-1* codifica para una proteína implicada en NER, un mecanismo de reparación que actúa cuando el daño afecta a varios nucleótidos que causan distorsiones estructurales en el ADN [Astin et al., 2008]. Este mecanismo se activa, por ejemplo, para el caso de las lesiones por UV que producen dimerización de pirimidinas [Noussipiel, 2009]. Por tanto el papel de XPA-1 es confirmar la presencia de una lesión y junto a la proteína de unión al ADN de cadena sencilla RPA estabilizar la apertura por unión a la cadena sin daño. Este gen mostró la misma respuesta que los dos genes anteriores, lo que nos confirma nuevamente una inhibición de los mecanismos de reparación. Sin embargo la activación de *ATR* a la menor concentración, sí indica una activación de un tipo de mecanismo de reparación, consistente en la detección y transducción de señales producidas por la dimerización de pirimidinas que se activa por la luz UV y la formación SSB del ADN [Smith et al., 2010; Stępnik et al., 2015].

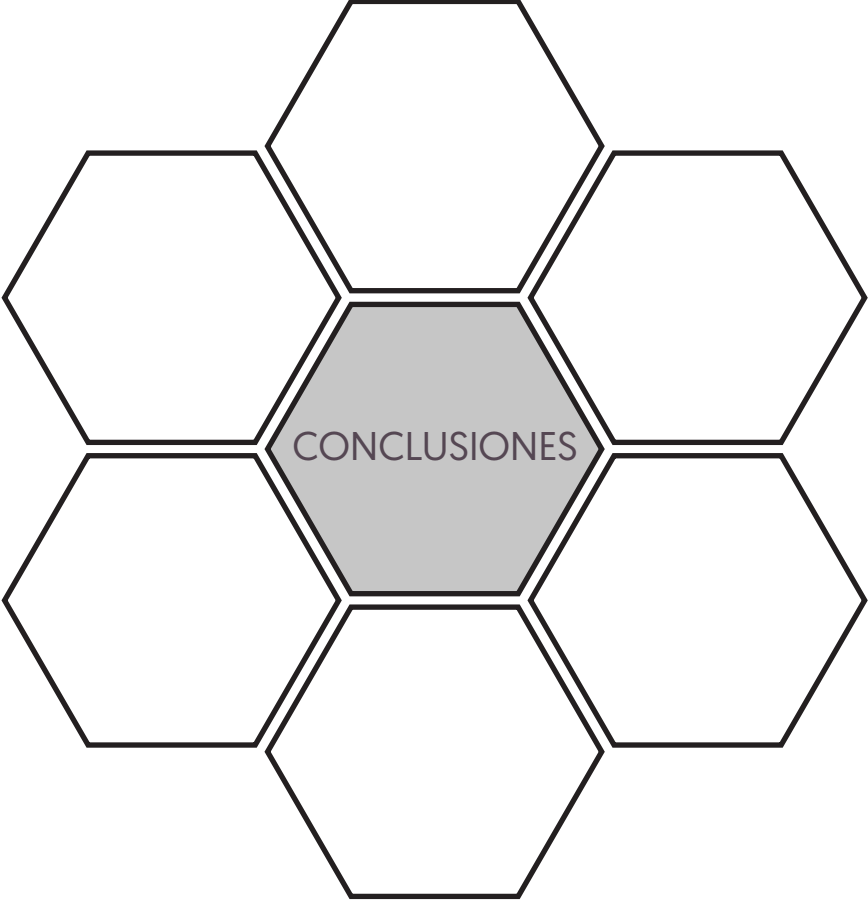
El análisis de *RAD-1*, implicado en la señalización del daño y la reparación de DSB [IJIJIMA et al., 2008], no mostró cambios en su expresión, lo que corrobora de nuevo que no se están activando los mecanismos de reparación por el compuesto. Por último, la no activación del gen *CASP3* indicaría que no se están desencadenando procesos apoptóticos.

En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis han demostrado que la Vz no produce efectos agudos en larvas de cuarto estadio de *C. riparius* y adultos de *P. acuta*. Sin embargo, se observaron efectos embriotóxicos en *C. riparius* que se vieron acentuados cuando la generación parental fue previamente expuesta. Además, la tendencia observada en el ensayo de reproducción de *C. riparius* muestra un ligero aumento de la fecundidad con la concentración de Vz. Estos efectos ecológicamente relevantes se relacionaron a nivel molecular con la inducción del gen *EcR* tanto en larvas como en embriones de *C. riparius*, así como en otros genes involucrados en el metabolismo de la ecdisona. Por lo que la Vz actuaría como un EDC en esta especie. Este hallazgo demuestra como un anti-andrógeno como la Vz produce efectos de mimetización de hormonas en organismos en los que no se han detectado andrógenos pero tienen hormonas esteroideas que pueden

verse afectadas, bien de forma directa o de forma indirecta. Sin embargo, esto no se observó en la otra especie utilizada [*P. acuta*], ya que no hubo cambios en la expresión de *ER*, para confirmar la falta de respuesta endocrina es necesario ampliar el estudio en esta especie. Por otro lado, la concentración que produjo efectos en genes del sistema endocrino también produjo activación de la respuesta de estrés celular en *C. riparius* [20 µg/L]. Los efectos en los genes de proteínas de estrés, podrían relacionarse tanto con la propia respuesta al estrés celular como con el sistema endocrino a través de procesos de maduración de receptores nucleares en los que se encuentran involucradas algunas de las HSP. Se ha observado además la activación de mecanismos de detoxificación similares a los observados previamente en vertebrados, lo que sugiere que el metabolismo de la Vz utiliza rutas comunes en vertebrados y *C. riparius* [Cyp4G]. Nuevamente *P. acuta*, tuvo un comportamiento diferente ya que se observó la inhibición de *Hsp20.4* y no hubo activación de ninguno de los genes estudiados de detoxificación. Con todo ello, se demuestra un mecanismo no homólogo entre las dos especies, probablemente debido a las diferencias fisiológicas. Para poder definir de manera más precisa cómo dichas diferencias afectan al mecanismo de acción y el metabolismo de la Vz se requiere ampliar el análisis de genes.

Junto a la combinación de estudios ecotoxicológicos y ensayos moleculares, se llevó a cabo el estudio genotóxico de la Vz en *C. riparius* y *P. acuta* mediante el ensayo cometa. Los datos obtenidos confirman los efectos genotóxicos tempranos de Vz ya que a las 24 h y a la menor concentración utilizada [20 µg/L] se induce DSB de ADN en ambas especies. Sin embargo, parece que *C. riparius* es capaz de activar las rutas de reparación del ADN mientras que *P. acuta* no ya que del pool de genes analizados sólo se observó una activación del gen *ATR*. La inhibición de genes de reparación de ADN en el caso de *P. acuta* se podría relacionar con un mayor daño al ADN.

Finalmente, la necesidad de estudiar la respuesta de EDC en distintas especies de invertebrados se pone de manifiesto en esta tesis doctoral, ya que dos especies de distinta filogenia respondieron a los efectos de un anti-andrógeno como la Vz de manera desigual. Estas diferencias observadas en algunos casos pueden deberse a la falta de información de una respecto de la otra. *C. riparius* es un organismo ampliamente utilizado en Ecotoxicología y para el que se dispone de mayor información molecular. Sin embargo, *P. acuta* es una especie escasamente explorada, especialmente en la respuesta a nivel molecular, por lo que los estudios llevados a cabo en esta tesis doctoral aportan nuevas herramientas para futuras investigaciones sobre EDC en moluscos.



7. Conclusiones

- El efecto de la Vz sobre la supervivencia de *Chironomus riparius* es variable, dependiendo de la fase que se analice. Para larvas no resulta tóxica, aunque es capaz de provocar un descenso del porcentaje de eclosión de los embriones al ser expuestos durante su embriogénesis que se ve acentuado cuando la generación parental es previamente expuesta.
- Los efectos tras exposiciones crónicas muestran una tendencia de aumento con la concentración para la fecundidad de *C. riparius*.
- La Vz no produce efectos en la supervivencia de *Physa acuta* a las concentraciones y tiempos de exposición estudiados.
- La Vz parece actuar como una pseudohormona capaz de modular la expresión del *EcR* y *E74* en larvas y embriones de *C. riparius*. Lo que refuerza la idea de su mecanismo de acción como disruptor endocrino.
- Los resultados de la actividad polisomal, mostraron una disminución en la traducción del ARNm del *EcR* y del *Kr-h1*. Esta falta de sincronización en los resultados puede sugerir que la Vz pueda afectar también a la síntesis de las proteínas de una forma no relacionada con la respuesta a ecdisona.
- El único receptor hormonal analizado en *P. acuta* [*ER*] no mostró cambios en su expresión, por lo que se requiere ampliar el estudio del efecto de la Vz a nivel de sistema endocrino en esta especie.
- La exposición a Vz desencadena una respuesta de estrés celular que se manifiesta, fundamentalmente, a través de una sobreexpresión del gen *Hsp70* en embriones y larvas de *C. riparius*. Por el contrario, en el caso de *P. acuta* sólo se observó una inhibición de la *Hsp20.4*.
- El metabolismo de destoxicación de las larvas de *C. riparius* se ha visto alterado en exposiciones agudas de Vz al inducir la expresión de *Cyp4G*. Ninguno de los genes de destoxicación estudiados *P. acuta* mostró una clara activación.

- La Vz es capaz de inducir daño genotóxico en ambas especies. Este efecto se manifiesta claramente por la inducción de roturas de doble hebra detectadas con el ensayo cometa.
- La sobreexpresión de *ATM* y *XRCC-1* [genes relacionados con la reparación del ADN], sugiere la activación de genes responsables de la reparación del daño al ADN. No obstante se detectó un efecto contrario para *P. acuta* en los genes *ATM* y *XRCC-2*, ya que la exposición a Vz provocó una inhibición.
- El estudio comparativo de distintas dianas moleculares en dos especies representativas de distintos taxones de invertebrados [insectos y moluscos] demuestra la sensibilidad variable entre especies también a este nivel de organización biológica.

7. Conclusions

- The effect of Vz on the survival of *C. riparius* varies, depending on the growth phase analyzed. For larvae it was not toxic, although it was able to decrease the percentage of hatching in embryos that were exposed during their embryogenesis, and was accentuated when the parental generation was previously exposed.
- Chronic Vz exposure showed a concentration-dependent increase in fecundity of *C. riparius*.
- Vz had no effect on the survival of *Physa acuta* at the concentrations and exposure times studied.
- Vz seems to act as a pseudohormone, able to modulate the expression of *EcR* and *E74* in larvae and embryos of *C. riparius*. This reinforces the idea of its mechanism of action as an endocrine disruptor.
- The results of polysomal activity tests showed a decrease in translation of *EcR* and *Kr-h1* mRNA. This lack of synchronization [non-polysome and polysome expression] in the results may suggest that Vz may also affect protein synthesis in a way that is unrelated to the ecdysone response.
- The only hormone receptor analyzed in *P. acuta* [*ER*] showed no changes in its expression. Therefore, it is necessary to expand the study of the effect of Vz at the endocrine system level in this species.
- Exposure to Vz triggered a cellular stress response that appeared mainly through upregulation of *Hsp70* in embryos and larvae of *C. riparius*. On the contrary, in the case of *P. acuta*, only inhibition of *Hsp20.4* was observed.
- The detoxification metabolism of *C. riparius* larvae was altered during acute exposure to Vz by induction of *Cyp4G* expression. None of the detoxification genes studied in *P. acuta* showed a clear activation.

- Vz caused genotoxic damage in both species, clearly manifested by the induction of double-strand DNA breaks detected with the comet assay.
- Upregulation of *ATM* and *XRCC-1* (genes related to DNA repair) suggests the activation of genes responsible for repair of DNA damage. However, an opposite effect was detected for *P. acuta* in the analogous *ATM* and *XRCC-2* genes, since Vz exposure led to inhibition.
- The comparative study of different molecular targets in two different representative invertebrate species (insects and mollusks) demonstrates the interspecies variability in sensitivity to environmental contaminants.

8. Bibliografía

- Al-Shami, S.A., Rawi, C.S.M., Ahmad, A.H., Nor, S.A.M., 2012. Genotoxicity of heavy metals to the larvae of *Chironomus kiiensis* Tokunaga after short-term exposure. *Toxicol. Ind. Health* 28, 734–9. <https://doi.org/10.1177/0748233711422729>
- Albrecht, C., Kroll, O., Moreno Terrazas, E., Wilke, T., 2009. Invasion of ancient Lake Titicaca by the globally invasive *Physa acuta* [Gastropoda: Pulmonata: Hygrophila]. *Biol. Invasions* 11, 1821–1826. <https://doi.org/10.1007/s10530-008-9360-9>
- Annamalai, J., Namasivayam, V., 2015. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife. *Environ. Int.* 76, 78–97. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.12.006>
- Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M., Skinner, M.K., 2005. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308, 1466–9. <https://doi.org/10.1126/science.1108190>
- Aquilino, M., Sánchez-Argüello, P., Martínez-Guitarte, J.-L., 2018. Genotoxic effects of vinclozolin on the aquatic insect *Chironomus riparius* [Diptera, Chironomidae]. *Environ. Pollut.* 232, 563–570. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.088>
- Aquilino, M., Sánchez-Argüello, P., Martínez-Guitarte, J.-L., 2016. Vinclozolin alters the expression of hormonal and stress genes in the midge *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 174, 179–87. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.001>
- Aquilino, M., Sánchez-Argüello, P., Novo, M., Martínez-Guitarte, J.-L., 2019. Effects on tadpole snail gene expression after exposure to vinclozolin. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, 568–577. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.015>
- Arrigo, A.P., 1998. Small stress proteins: chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biol. Chem.* 379, 19–26.
- Bakthisaran, R., Tangirala, R., Rao, C.M., 2015. Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1854, 291–319. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.12.019>
- Bandow, C., Weltje, L., 2012. Development of an embryo toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis* using the model substance tributyltin and common solvents. *Sci. Total Environ.* 435–436, 90–5. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.005>
- Barouki, R., 2017. Endocrine disruptors: Revisiting concepts and dogma in toxicology. *C. R. Biol.* 340, 410–413. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.005>
- Bednarek, A., Sawadro, M., Babczyńska, A., 2016. Modulation of the response to stress factors of *Xerolycosa nemoralis* [Lycosidae] spiders living in contaminated environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 131, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.04.027>
- Bender, M., Imam, F.B., Talbot, W.S., Ganetzky, B., Hogness, D.S., 1997. *Drosophila* Ecdysone Receptor Mutations Reveal Functional Differences among Receptor Isoforms, *Cell*.

- Berg, M.B., Hellenthal, R.A., 1992. The role of Chironomidae in energy flow of a lotic ecosystem. *Netherlands J. Aquat. Ecol.* 26, 471–476. <https://doi.org/10.1007/BF02255277>
- Berger, E.M., Goudie, K., Klieger, L., Berger, M., DeCato, R., 1992. The juvenile hormone analogue, methoprene, inhibits ecdysterone induction of small heat shock protein gene expression. *Dev. Biol.* 151, 410–418. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(92\)90181-F](https://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90181-F)
- Bernabò, P., Gaglio, M., Bellamoli, F., Viero, G., Lencioni, V., 2017. DNA damage and translational response during detoxification from copper exposure in a wild population of *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 173, 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.052>
- Bernabò, P., Lunelli, L., Quattrone, A., Jousson, O., Lencioni, V., Viero, G., 2015. Studying translational control in non-model stressed organisms by polysomal profiling. *J. Insect Physiol.* 76, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.03.011>
- Bilal, M., Iqbal, H.M.N., 2019. An insight into toxicity and human-health-related adverse consequences of cosmeceuticals — A review. *Sci. Total Environ.* 670, 555–568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.261>
- Birnbaum, L.S., 2013. State of the science of endocrine disruptors. *Environ. Health Perspect.* 121, A107. <https://doi.org/10.1289/ehp.1306695>
- Brem, R., Hall, J., 2005. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Res.* 33, 2512–20. <https://doi.org/10.1093/nar/gki543>
- Buttke, D.E., Sircar, K., Martin, C., 2012. Exposures to endocrine-disrupting chemicals and age of menarche in adolescent girls in NHANES (2003–2008). *Environ. Health Perspect.* 120, 1613–8. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104748>
- Casati, L., Sendra, R., Sibilia, V., Celotti, F., 2015. Endocrine disruptors: the new players able to affect the epigenome. *Front. Cell Dev. Biol.* 3, 37. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00037>
- Charles, J., J.-P., Iwema, T., Epa, V.C., Takaki, K., Rynes, J., Jindra, M., 2011. Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 21128–21133. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116123109>
- Chen, H., Zha, J., Liang, X., Li, J., Wang, Z., 2014. Effects of the human antiepileptic drug carbamazepine on the behavior, biomarkers, and heat shock proteins in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Aquat. Toxicol.* 155, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.06.001>
- Collins, A.R., Dusinská, M., Gedik, C.M., Stětina, R., 1996. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ. Health Perspect.* 104, 465–469. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s3465>
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M., Robles, M., 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21, 3674–3676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>

- Dermauw, W., Van Leeuwen, T., 2014. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45, 89–110. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.001>
- Ding, Y., Ortelli, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J., Ranson, H., 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-4-35>
- Dorstyn, L., Read, S.H., Quinn, L.M., Richardson, H., Kumar, S., 1999. DECAP, a Novel *Drosophila* Caspase Related to Mammalian Caspase-3 and Caspase-7. *J. Biol. Chem.* 274, 30778–30783. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.30778>
- Ducrot, V., Teixeira-Alves, M., Lopes, C., Delignette-Muller, M.-L., Charles, S., Lagadic, L., 2010. Development of partial life-cycle experiments to assess the effects of endocrine disruptors on the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*: a case-study with vinclozolin. *Ecotoxicology* 19, 1312–21. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0518-8>
- EC, 2000. Towards the establishment of a priority list of substances for further evaluation of their role in endocrine disruption. European Commission DG ENV, Delft.
- Eckl, J.M., Richter, K., 2013. Functions of the Hsp90 chaperone system: lifting client proteins to new heights. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 4, 157–65.
- Edwards, T.M., Myers, J.P., 2007. Environmental Exposures and Gene Regulation in Disease Etiology. *Environ. Health Perspect.* 115, 1264–1270. <https://doi.org/10.1289/ehp.9951>
- EFSA, 2015. The 2015 European Union report on pesticide residues in food, EFSA Journal. European Food Safety Authority, Parma. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4791>
- El-Shahat, M.F., Al-Nawayseh, K.M., Jiries, A.G., Alnasir, F.M., 2003. Pesticides and heavy metal distribution in southern Dead Sea basin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 1230–8. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(97\)00101-X](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(97)00101-X)
- Elyse Ireland, H., Harding, S.J., Bonwick, G.A., Jones, M., Smith, C.J., Williams, J.H.H., 2004. Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor*. *Biomarkers* 9, 139–55. <https://doi.org/10.1080/13547500410001732610>
- EPA Office of Pesticide Programs, U., 2000. US EPA - Pesticides - Fact Sheet for Vinclozolin. Environmental Protection Agency, California.
- Flood, S., Burkholder, J., Cope, G., 2018. Assessment of atrazine toxicity to the estuarine phytoplankter, *Dunaliella tertiolecta* [Chlorophyta], under varying nutrient conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 25, 11409–11423. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1310-1>
- Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal, M., van der Ploeg, M., van de Zee, S.E.A.T.M., Ritsema, C.J., 2015. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *Int. Soil Water Conserv. Res.* 3, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>

- Ghazaei, C., 2017. Role and mechanism of the Hsp70 molecular chaperone machines in bacterial pathogens. *J. Med. Microbiol.* 66, 259–265. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000429>
- Giguère, V., 2002. To ERR in the estrogen pathway. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 220–5.
- Gkouvitass, T., Kontogiannatos, D., Kourtis, A., 2008. Differential expression of two small Hsps during diapause in the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* [Lef.]. *J. Insect Physiol.* 54, 1503–10. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.08.009>
- Gray, L.E., Ostby, J., Furr, J., Wolf, C.J., Lambright, C., Parks, L., Veeramachaneni, D.N., Wilson, V., Price, M., Hotchkiss, A., Orlando, E., Guillette, L., 2001. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Hum. Reprod. Update* 7, 248–64. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2001.tb05780.x>
- Gu, J., Huang, L.-X., Shen, Y., Huang, L.-H., Feng, Q.-L., 2012. Hsp70 and small Hsps are the major heat shock protein members involved in midgut metamorphosis in the common cutworm, *Spodoptera litura*. *Insect Mol. Biol.* 21, 535–543. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2012.01158.x>
- Guittard, E., Blais, C., Maria, A., Parvy, J.-P., Pasricha, S., Lumb, C., Lafont, R., Daborn, P.J., Dauphin-Villemant, C., 2011. CYP18A1, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. *Dev. Biol.* 349, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.09.023>
- Guleria, A., Chandna, S., 2016. ATM kinase: Much more than a DNA damage responsive protein. *DNA Repair [Amst]*. 39, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.12.009>
- 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, e14008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014008>
- Habdija, I., Lajtner, J., Belinić, I., 1995. The Contribution of Gastropod Biomass in Macro-benthic Communities of a Karstic River. *Int. Rev. der gesamten Hydrobiol. und Hydrogr.* 80, 103–110. <https://doi.org/10.1002/iroh.19950800113>
- 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 Chaperones* 12, 364–72. <https://doi.org/10.1379/CSC-308.1>
- IJIMA, K., OHARA, M., SEKI, R., TAUCHI, H., 2008. Dancing on Damaged Chromatin: Functions of ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 Complex in Cellular Responses to DNA Damage. *J. Radiat. Res.* 49, 451–464. <https://doi.org/10.1269/jrr.08065>
- ISO, 2012. Water quality — Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. The Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E., 2010. Phase II drug metabolizing enzymes.

- Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 241–258. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>
- Kajiwara, M., Kuraku, S., Kurokawa, T., Kato, K., Toda, S., Hirose, H., Takahashi, S., Shibata, Y., Iguchi, T., Matsumoto, T., Miyata, T., Miura, T., Takahashi, Y., 2006. Tissue preferential expression of estrogen receptor gene in the marine snail, *Thais clavigera*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148, 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.03.016>
- Kawaguchi, R., Girke, T., Bray, E.A., Bailey-Serres, J., 2004. Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 38, 823–39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02090.x>
- Kelce, W.R., Wilson, E.M., 1997. Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. *J. Mol. Med. [Berl.]* 75, 198–207.
- Kim, H.J., Koedrith, P., Seo, Y.R., 2015. Ecotoxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of environmental chemical toxicity using aquatic invertebrate, *Daphnia* model organism. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 12261–87. <https://doi.org/10.3390/ijms160612261>
- Kimura, I., Nakayama, Y., Konishi, M., Terasawa, K., Ohta, M., Itoh, N., Fujimoto, M., 2012. Functions of MAPR [membrane-associated progesterone receptor] family members as heme/steroid-binding proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 687–96.
- King, H.A., Gerber, A.P., 2014. Translatome profiling: methods for genome-scale analysis of mRNA translation. *Brief. Funct. Genomics* 44, 1–26. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elu045>
- Lange, A., Sebire, M., Rostkowski, P., Mizutani, T., Miyagawa, S., Iguchi, T., Hill, E.M., Tyler, C.R., 2015. Environmental chemicals active as human antiandrogens do not activate a stickleback androgen receptor but enhance a feminising effect of oestrogen in roach. *Aquat. Toxicol.* 168, 48–59. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2015.09.014>
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic [marine and freshwater] animals. *Mutat. Res.* 544, 43–64. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00017-6)
- Lee, S.-W., Chatterjee, N., Im, J.-E., Yoon, D., Kim, S., Choi, J., 2018. Integrated approach of eco-epigenetics and eco-metabolomics on the stress response of bisphenol-A exposure in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 163, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.084>
- Lemos, M.F.L., van Gestel, C.A.M., Soares, A.M.V.M., 2010a. Reproductive toxicity of the endocrine disruptors vinclozolin and bisphenol A in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* [Latreille, 1804]. *Chemosphere* 78, 907–13. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.063>
- Lemos, M.F.L., van Gestel, C.A.M., Soares, A.M.V.M., 2010b. Developmental Toxicity of Endocrine Disruptors Bisphenol A and Vinclozolin in a Terrestrial Isopod. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 274–281. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9474-9>

- Lencioni, V., Grazioli, V., Rossaro, B., Bernabò, P., 2016. Transcriptional profiling induced by pesticides employed in organic agriculture in a wild population of *Chironomus riparius* under laboratory conditions. *Sci. Total Environ.* 557–558, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.062>
- Lima, D., Reis-Henriques, M.A., Silva, R., Santos, A.I., Filipe C. Castro, L., Santos, M.M., 2011. Tributyltin-induced imposex in marine gastropods involves tissue-specific modulation of the retinoid X receptor. *Aquat. Toxicol.* 101, 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.022>
- Lindquist, S., Craig, E.A., 1988. The Heat-Shock Proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631–677. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.003215>
- London, R.E., 2015. The structural basis of XRCC1-mediated DNA repair. *DNA Repair [Amst.]* 30, 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.02.005>
- Ma, Y., He, X., Qi, K., Wang, T., Qi, Y., Cui, L., Wang, F., Song, M., 2019. Effects of environmental contaminants on fertility and reproductive health. *J. Environ. Sci.* 77, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.07.015>
- Maier, T., Güell, M., Serrano, L., 2009. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 583, 3966–73. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.036>
- Marinković, M., de Leeuw, W.C., de Jong, M., Kraak, M.H.S., Admiraal, W., Breit, T.M., Jonker, M.J., 2012. Combining next-generation sequencing and microarray technology into a transcriptomics approach for the non-model organism *Chironomus riparius*. *PLoS One* 7, e48096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048096>
- Martín-Folgar, R., de la Fuente, M., Morcillo, G., Martínez-Guitarte, J.-L., 2015. Characterization of six small HSP genes from *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae): Differential expression under conditions of normal growth and heat-induced stress. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 188, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.06.023>
- Martínez-Guitarte, J.L., 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*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 147, 590–596. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.03.015>
- Martínez-Paz, P., Morales, M., Sánchez-Argüello, P., Morcillo, G., Martínez-Guitarte, J.L., 2017. Cadmium *in vivo* exposure alters stress response and endocrine-related genes in the freshwater snail *Physa acuta*. New biomarker genes in a new model organism. *Environ. Pollut.* 220, 1488–1497. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.012>
- Matsuura, H., Ishibashi, Y., Shinmyo, A., Kanaya, S., Kato, K., 2010. Genome-wide analyses of early translational responses to elevated temperature and high salinity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq010>

- Matthiessen, P., Ankley, G.T., Biever, R.C., Bjerregaard, P., Borgert, C., Brugger, K., Blankinship, A., Chambers, J., Coady, K.K., Constantine, L., Dang, Z., Denslow, N.D., Dreier, D.A., Dungey, S., Gray, L.E., Gross, M., Guiney, P.D., Hecker, M., Holbech, H., Iguchi, T., Kadlec, S., Karouna-Renier, N.K., Katsiadaki, I., Kawashima, Y., Kloas, W., Krueger, H., Kumar, A., Lagadic, L., Leopold, A., Levine, S.L., Maack, G., Marty, S., Meador, J., Mihaich, E., Odum, J., Ortego, L., Parrott, J., Pickford, D., Roberts, M., Schaefers, C., Schwarz, T., Solomon, K., Verslycke, T., Weltje, L., Wheeler, J.R., Williams, M., Wolf, J.C., Yamazaki, K., 2017. Recommended approaches to the scientific evaluation of ecotoxicological hazards and risks of endocrine-active substances. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 13, 267–279. <https://doi.org/10.1002/ieam.1885>
- Mayer, M.P., Bukau, B., 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 670–84. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6>
- Maynard, J.C., Pham, T., Zheng, T., Jockheck-Clark, A., Rankin, H.B., Newgard, C.B., Spana, E.P., Nicchitta, C. V., 2010. Gp93, the *Drosophila* GRP94 ortholog, is required for gut epithelial homeostasis and nutrient assimilation-coupled growth control. *Dev. Biol.* 339, 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.12.023>
- McCarrey, J.R., Lehle, J.D., Raju, S.S., Wang, Y., Nilsson, E.E., Skinner, M.K., 2016. Tertiary Epimutations - A Novel Aspect of Epigenetic Transgenerational Inheritance Promoting Genome Instability. *PLoS One* 11, e0168038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168038>
- Mifsud, W., Bateman, A., 2002. Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome b5-like ligand-binding domain. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0068.
- Møller, P., 2018. The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis* 33, 1–7. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex046>
- Morales, C., Wu, S., Yang, Y., Hao, B., Li, Z., 2009. *Drosophila* Glycoprotein 93 Is an Ortholog of Mammalian Heat Shock Protein gp96 [grp94, HSP90b1, HSPC4] and Retains Disulfide Bond-Independent Chaperone Function for TLRs and Integrins. *J. Immunol.* 183, 5121–5128. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900811>
- Morales, M., Martínez-Paz, P., Ozáez, I., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., Luis Martínez-Guitarte, J., Morcillo, G., 2013. DNA damage and transcriptional changes induced by tributyltin [TBT] after short *in vivo* exposures of *Chironomus riparius* [Diptera] larvae. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 158, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.05.005>
- Morales, M., Martínez-Paz, P., Sánchez-Argüello, P., Morcillo, G., Martínez-Guitarte, J.L., 2018. Bisphenol A [BPA] modulates the expression of endocrine and stress response genes in the freshwater snail *Physa acuta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 152, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.034>
- Morrow, G., Battistini, S., Zhang, P., Tanguay, R.M., 2004. Decreased lifespan in the absence of expression of the mitochondrial small heat shock protein Hsp22 in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 279, 43382–5. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400357200>

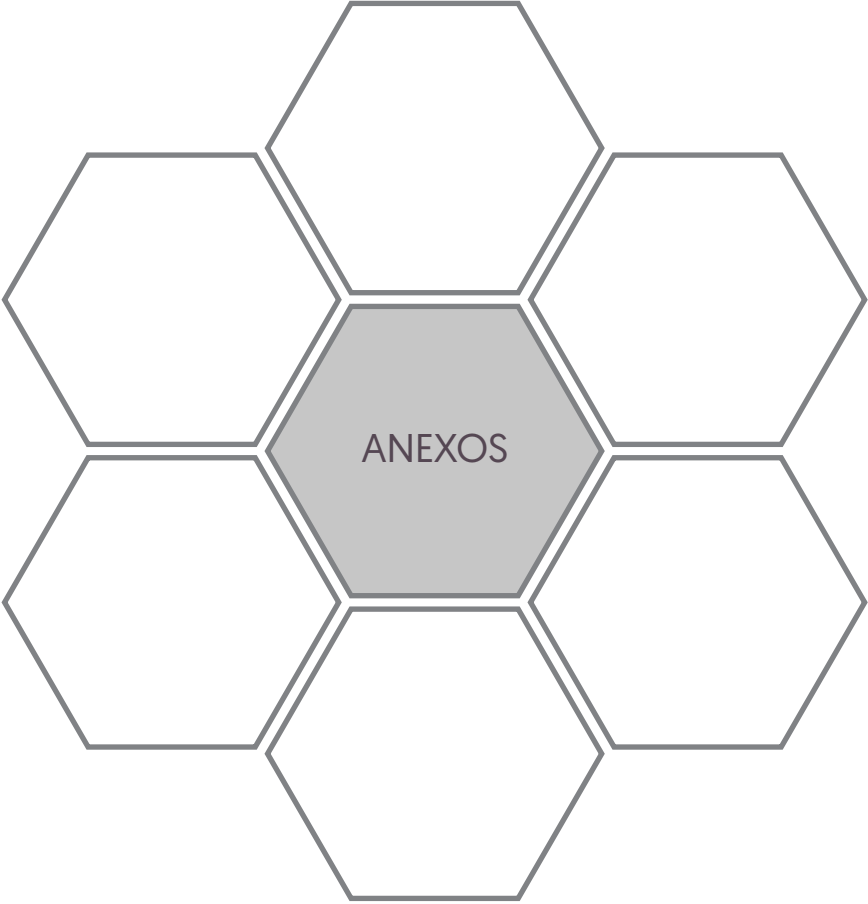
- Morrow, G., Hightower, L.E., Tanguay, R.M., 2015. Small heat shock proteins: big folding machines. *Cell Stress Chaperones* 20, 207–212. <https://doi.org/10.1007/s12192-014-0561-0>
- Murnyak, G., Vandenberg, J., Yaroschak, P.J., Williams, L., Prabhakaran, K., Hinz, J., 2011. Emerging contaminants: presentations at the 2009 Toxicology and Risk Assessment Conference. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 254, 167–9. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.10.021>
- Nair, P.M.G., Choi, J., 2011. Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathione S-transferase [GST] genes in response to cadmium and silver nanoparticles exposure. *Aquat. Toxicol.* 101, 550–560. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.12.006>
- Nair, P.M.G., Park, S.Y., Choi, J., 2013. Evaluation of the effect of silver nanoparticles and silver ions using stress responsive gene expression in *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 92, 592–9. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.060>
- Nair, P.M.G., Park, S.Y., Choi, J., 2011. Expression of catalase and glutathione S-transferase genes in *Chironomus riparius* on exposure to cadmium and nonylphenol. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 154, 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.07.008>
- Nishikawa, J.-I., Mamiya, S., Kanayama, T., Nishikawa, T., Shiraishi, F., Horiguchi, T., 2004. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6271–6.
- OECD, 2016a. Test No. 242: Potamopyrgus antipodarum Reproduction Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264311-en>
- OECD, 2016b. Test No. 243: *Lymnaea stagnalis* Reproduction Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. The Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264335-en>
- OECD, 2014. Detailed Review Paper [DRP] on Molluscs Life-cycle Toxicity Testing, OECD Series on Testing and Assessment. The Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264221468-en>
- OECD, 2012. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. The Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264185203-en>
- OECD, 2011a. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. The Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2011b. Test No. 235: *Chironomus* sp., Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. The Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264122383-en>
- OECD, 2010. Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment. The Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

- OECD, 2004a. Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>
- OECD, 2004b. Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water. The Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2004c. Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. The Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264070264-en>
- Ojani, R., Liu, P., Fu, X., Zhu, J., 2016. Protein kinase C modulates transcriptional activation by the juvenile hormone receptor methoprene-tolerant. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 70, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.12.001>
- Paoloni-Giacobino, A., 2014. Epigenetic effects of methoxychlor and vinclozolin on male gametes. *Vitam. Horm.* 94, 211–27. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800095-3.00008-0>
- Park, K., Bang, H.W., Park, J., Kwak, I.-S., 2009. Ecotoxicological multilevel-evaluation of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae. *Chemosphere* 77, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.019>
- Pennisi, R., Ascenzi, P., di Masi, A., 2015. Hsp90: A New Player in DNA Repair? *Biomolecules* 5, 2589–618. <https://doi.org/10.3390/biom5042589>
- Prat, N., Rieradevall, M., 1995. Life cycle and production of Chironomidae [Diptera] from Lake Banyoles [NE Spain]. *Freshw. Biol.* 33, 511–524. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1995.tb00410.x>
- Rasmussen, J.B., 1985. Effects of Density and Microdetritus Enrichment on the Growth of Chironomid Larvae in a Small Pond. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 1418–1422. <https://doi.org/10.1139/f85-177>
- Rempel, M.A., Schlenk, D., 2008. Effects of environmental estrogens and antiandrogens on endocrine function, gene regulation, and health in fish. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 267, 207–52. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)00605-9](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)00605-9)
- Rewitz, K.F., Rybczynski, R., Warren, J.T., Gilbert, L.I., 2006. The Halloween genes code for cytochrome P450 enzymes mediating synthesis of the insect moulting hormone. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1256–60. <https://doi.org/10.1042/BST0341256>
- Riddiford, L.M., 1978. Ecdysone-induced change in cellular commitment of the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, at the initiation of metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 34, 438–446. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(78\)90284-8](https://doi.org/10.1016/0016-6480(78)90284-8)
- Robitaille, C.N., Rivest, P., Sanderson, J.T., 2015. Antiandrogenic Mechanisms of Pesticides in Human LNCaP Prostate and H295R Adrenocortical Carcinoma Cells. *Toxicol. Sci.* 143, 126–135. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu212>

- Romiguier, J., Gayral, P., Ballenghien, M., Bernard, A., Cahais, V., Chenuil, A., Chiari, Y., Dernet, R., Duret, L., Faivre, N., Loire, E., Lourenco, J.M., Nabholz, B., Roux, C., Tsagkogeorga, G., Weber, A.A.-T., Weinert, L.A., Belkhir, K., Bierne, N., Glémin, S., Galtier, N., 2014. Comparative population genomics in animals uncovers the determinants of genetic diversity. *Nature* 515, 261–263. <https://doi.org/10.1038/nature13685>
- Rupinder, S.K., Gurpreet, A.K., Manjeet, S., 2007. Cell suicide and caspases. *Vascul. Pharmacol.* 46, 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2007.01.006>
- Ryu, C.S., Klein, K., Zanger, U.M., 2017. Membrane Associated Progesterone Receptors: Promiscuous Proteins with Pleiotropic Functions – Focus on Interactions with Cytochromes P450. *Front. Pharmacol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00159>
- Sánchez-Argüello, P., Aparicio, N., Fernández, C., 2012. Linking embryo toxicity with genotoxic responses in the freshwater snail *Physa acuta*: single exposure to benzo[a]pyrene, fluoxetine, bisphenol A, vinclozolin and exposure to binary mixtures with benzo[a]pyrene. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.02.029>
- Sánchez-Argüello, P., Aparicio, N., Guevara, M.A., Díaz, L., Cervera, M.T., Fernández, C., 2016. Effects on reproduction, genotoxicity and DNA methylation pattern after chronic exposure of the freshwater snail *Physa acuta* [Gastropoda, Pulmonata] to vinclozolin. *Austin J. Environ. Toxicol.* 2, 1008.
- Sánchez-Argüello, P., Fernández, C., Tarazona, J. V., 2009. Assessing the effects of fluoxetine on *Physa acuta* [Gastropoda, Pulmonata] and *Chironomus riparius* [Insecta, Diptera] using a two-species water–sediment test. *Sci. Total Environ.* 407, 1937–1946. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.12.004>
- Schuetz, E., 2001. Induction of Cytochromes P450. *Curr. Drug Metab.* 2, 139–147. <https://doi.org/10.2174/1389200013338595>
- Siddique, S., Kubwabo, C., Harris, S.A., 2016. A review of the role of emerging environmental contaminants in the development of breast cancer in women. *Emerg. Contam.* 2, 204–219. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.003>
- Skinner, M.K., Anway, M.D., 2007. Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on the development of disease and cancer. *Crit. Rev. Oncog.* 13, 75–82. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.v13.i1.30>
- Stange, D., Sieratowicz, A., Oehlmann, J., 2012. Imposex development in *Nucella lapillus* – Evidence for the involvement of retinoid X receptor and androgen signalling pathways *in vivo*. *Aquat. Toxicol.* 106–107, 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.10.010>
- Stępnik, M., Spryszyńska, S., Smok-Pieniążek, A., Ferlińska, M., Roszak, J., Nocuń, M., 2015. The modulating effect of ATM, ATR, DNA-PK inhibitors on the cytotoxicity and genotoxicity of benzo[a]pyrene in human hepatocellular cancer cell line HepG2. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 988–996. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.10.010>

- Sunyer, J., Jarvis, D., Gotschi, T., Garcia-Esteban, R., Jacquemin, B., Aguilera, I., Ackerman, U., de Marco, R., Forsberg, B., Gislason, T., Heinrich, J., Norback, D., Villani, S., Kunzli, N., 2006. Chronic bronchitis and urban air pollution in an international study. *Occup. Environ. Med.* 63, 836–843. <https://doi.org/10.1136/oem.2006.027995>
- 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, 221–30. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0117-x>
- Tambini, C.E., Spink, K.G., Ross, C.J., Hill, M.A., Thacker, J., 2010. The importance of XRCC2 in RAD51-related DNA damage repair. *DNA Repair [Amst.]* 9, 517–525. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.01.016>
- Tassou, K.T., Schulz, R., 2009. Effects of the insect growth regulator pyriproxyfen in a two-generation test with *Chironomus riparius*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1058–1062. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.02.001>
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 231–41. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>
- Thompson, C., Weinberger, C., Lebo, R., Evans, R., 1987. Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system. *Science [80-]* 237, 1610–1614. <https://doi.org/10.1126/science.3629259>
- Thornton, J.W., Need, E., Crews, D., 2003. Resurrecting the Ancestral Steroid Receptor: Ancient Origin of Estrogen Signaling. *Science [80-]* 301, 1714–1717. <https://doi.org/10.1126/science.1086185>
- Tillmann, M., Schulte-Oehlmann, U., Duft, M., Markert, B., Oehlmann, J., 2001. Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails [Mollusca: Gastropoda] in the laboratory. Part III: Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology* 10, 373–88.
- Tsvetkova, N.M., Horváth, I., Török, Z., Wolkers, W.F., Balogi, Z., Shigapova, N., Crowe, L.M., Tablin, F., Vierling, E., Crowe, J.H., Vigh, L., 2002. Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13504–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.192468399>
- US-EPA, 2000. Registration eligibility decision facts—vinclozolin, Report N°EPA-738F00021. United States Environ. Prot. Agency, Washingt. DC, 114 pp.
- USEPA, 2000. Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates Second Edition. United States Environmental Protection Agency, Washington.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
- Valsamaki, V.I., Sakkas, V.A., Albanis, T.A., 2007. Determination of the pesticides considered as endocrine-disrupting compounds [EDCs] by solid-phase extraction followed by gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection. *J. Sep. Sci.* 30, 1936–46. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600487>

- van Ravenzwaay, B., Kolle, S.N., Ramirez, T., Kamp, H.G., 2013. Vinclozolin: A case study on the identification of endocrine active substances in the past and a future perspective. *Toxicol. Lett.* 223, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.03.029>
- Vandeghechuchte, M.B., Lemièrre, F., Vanhaecke, L., Vanden Berghe, W., Janssen, C.R., 2010. Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA methylation. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 151, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.11.007>
- Watermann, B.T., Albanis, T.A., Galassi, S., Gnass, K., Kusk, K.O., Sakkas, V.A., Wollenberger, L., 2016. Effects of anti-androgens cyproterone acetate, linuron, vinclozolin, and p,p'-DDE on the reproductive organs of the copepod *Acartia tonsa*. *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 51, 1111–20. <https://doi.org/10.1080/10934529.2016.1199769>
- Wu, Y.H., Wu, T.M., Hong, C.Y., Wang, Y.S., Yen, J.H., 2014. Screening differentially expressed genes in an amphipod [*Hyalella azteca*] exposed to fungicide vinclozolin by suppression subtractive hybridization. *J. Environ. Sci. Health. B.* 49, 856–63. <https://doi.org/10.1080/03601234.2014.938556>
- Yamanaka, N., Rewitz, K.F., O'Connor, M.B., 2013. Ecdysone Control of Developmental Transitions: Lessons from *Drosophila* Research. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 497–516. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153608>
- Yuan, S., Huang, C., Ji, X., Ma, M., Rao, K., Wang, Z., 2018. Prediction of the combined effects of multiple estrogenic chemicals on MCF-7 human breast cancer cells and a preliminary molecular exploration of the estrogenic proliferative effects and related gene expression. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 160, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.025>
- Zhang, H.-H., Li, S.-Z., Zhang, Z.-Y., Hu, X.-M., Hou, P.-N., Gao, L., Du, R.-L., Zhang, X.-D., 2014. Nemo-like kinase is critical for p53 stabilization and function in response to DNA damage. *Cell Death Differ.* 21, 1656–1663. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.78>



ANEXO I

Secuencias empleadas para el posterior diseño de las parejas de oligonucleótidos que han permitido amplificar los genes de *Physa acuta*.

ATM

CAGATTCTAAAGCTAGATAAACTGGACAATGTTCTGTTGCCTTCTGTTGAGCTAGATGTTGACC
CATCAGGAGCCTACACCAGCCTTGTTTCACCTGTAAGATTTGATAAAAAATATGAAACTGTTGG
GGGAATCAACTTACCCAAGGTGATCAAATGTCTGGGCTCTGATGGGCACCTGAGGACGCAACTT
GTCAAGGGTCAGGATGACCTGCGACAAGATGCGGTGATGCAGCAGGTTTTCTCCCTGGTCAACC
AGCTGCTGGCAGGGGCACCAGAGACCAGGCAGAGACAGCTGAACATCAGGACATACAAGGTGAT
TCCACTGAGCCAGAAGTGTGGGCTGCTTCAGTGGTGTGAGGGGACACAACCACTGGGGGAATAC
TTGATAGGAACAACCCGCTCACCTGGCGCCCACCCATGTACAGACCTAAAGACTGGCTCCCCA
GGGACTGCAGGAACCACCTACATAATTCTGGCAATGAGCCAGACAAAAGGTTTTAAGGCCTATCA
GGAGATCTGTGCCAACTTTAAACCAGTCTTCAGGTATTTCTTCATGGAGAATTTTCATGGAGCCT
TCAACTTGGTTTTGAGAAACGTCTGATCTACACACGTAGTGTGCTACCACTTCTATTGTGGGCT
ACATACTAGGGCTGGGTGACCGCCATCTGATGAATATTCTCATTGACAAACAAACTGCAGAGTT
GGTCCATATCGACCTGGGAATTGCCTTTGACATGGGACACATCCTTCCTACCCAGAGACTGTT
CCGTTTAGATTAACCAGGGACATAGTGGATGGGATGGGGGTCACAGGGGTTGAAGGTGTCTTTA
GAAGGTGTTGTGAGCAGACCATGCATGTGATGAAGACCAACAGCGAGTCTCTGCTGACCATTGT
CCAGGTGCTGCTGCATGACCCACTGTCACACTGGACACTAACACCCCAGCAGGCGCTGACCATT
CAGAGGAAACGTGAGCAGGCAAACCAAGACATTATGGAACAGTCCATGGCTGCCAGTTTTTCAGG
TGCCATCCAGTGGTCAAATACCTGCTAGTGGTCAGCCTCCAGCCACTCTAGGACTGGCAGGCGG
AGACCTTGAACCAGAGGATCAGATTCCAAAGACCAGAACAACACTGGCAGAGAGAACTCTCCTG
CGTCTGAAGCAGAAGTTAAATGGACAAGAGGGCAATGCACAGCTGAGTGTATCTGGCCAGGTCA
ATTTCTCATCCAAATGGCAAGTGATCCCAGAAACCTTTGCAAATTGTTTGCAGGCTGGCAGCC
ATATTTGTAG

ATR

TCAAATCTTATAAAAATGTCATTGCTGCTTGCCCAGAATGGGAAGATGGATATTTTCATCTAGC
 CAAGTATTATGATCGTGTGATGAATACCATCATTGATGATAAAGATAAAGCTGAGAAACAAGGG
 GATTTTCATCATTTATGTGGTGAGAAACTTTGGCCACTCCTTGCAGTATGGCAACCAGCACATTT
 ACCAGTCCTTGCCTCGACTGCTGAGCCTGTGGCTGGACTACGGCACCGTTGTTGTAGAGGCTGA
 GAGACGGGACAAAGGCCAAACAAACACAGAACTCAAGAACCAAAGGACTGTTCTCAAAGGATT
 AATGATATAATTTGTGAACATAAACCAAGAGCTTTCTCCTTACCAAATGTTTACAGCCTTTGCGC
 AGCTGATATCTCGCATCTGTCAACAGATGTCTTTCATTGTTCTTAAGGAAATAATTTTC
 TCGTTTTGTTGATAGAGTATCCACATCAAGCAATCTGGATGATGATGGCTGTATCAAAGTCCTCC
 TATAAGAGAAGAGCTGAGAGATGTACAGACATATTTGCTACAGCAGTACAAAAAGACCAGGCT
 TGTCTAAATTAATCCAGGATTACATCCGCCAACAGATCATCTAATTGAAGTGTGTGAGAAACA
 TCTGGATCCAGGAAGTACCAGCTTAAATGTGACTTTTCGACCTCTAAAGCGCTTGTGAGGAT
 AGGAACCTGAGCCAAATGCTGCTGCCACCCAAGCTTCAGTGTGTGTCAAGCTGCCAGCTACTA
 TAGCCAGAGACCAACAGCACAGTCCCTTCCCAGACAATCCCATTTACATCCAGGGCTTTGAGGA
 CAATATTGAAGTTCTCCCATCACTGCAAAGACCAAAAAAGATTACAATACTGGGAAGTGATGGT
 CAGCGTTATGTCATGATGTGCAAGCCCAGGGATGATCTACGCAAGGATTGCCGCTTGATGGATT
 TTAACAATGTGGTCAACAGATTTCTTCGTAGAGACCCAGAATCCAGGCGTAGAGGTTTACTTAT
 TCGAACTTATAATGTGACACCACTAAACAAAGAGTGTGGGTTAATCGAGTGGGTGAACAACACA
 ACTGGACTACGCCATGTTTTGTTGAAGCTTTTACAAACAGAGAGGCATCTTCATGACAGGAAAGG
 AACTAACTGCATTGAAACCTCCTCTAAATGCCAGTATAGAACTAAAATGAAAATTTTCAAGGA
 GAAGCTGCTACCCAAACATCCTCCCCTGTTTCTGAGTGGTTCTTAAGGACATTCCCTGACCCC
 ACCTCATGGTATAGTGCTAGAGTATCCTATGCAAGGACTGCAGCTGTGATGAGTATGGTAGGAT
 ACATTCTAGGCCTAGGAGACCGGCATGGAGAGAATATCCTCTTTGATTCAACAACCTGGGGACTG
 CATTTCATGTTGATTTTAACTGCCTGTTTAAATAAGGGAGAACTTTTGGAGTGGCCTGAGAGAGTC
 CCTTTTCGTCTAACACACAACATGACAGCAGCTTTTGGACCACTGGGCTATGAAGGTGTGTTCA
 GCGGAGCATGTGAGATGACTCTCAAAGTGATACGTGATCAGATGGACCACTCATGAGTGTGCT
 CAAACCTTTCATCTATGACCCTCTGGTGGAGTGGAGCACACAGTCCCAAGGGGACAGCACTCC
 AGTGAACAGGGGAGATAAATAATGAGCTGGCTTTAAGTCATGTTTCAAGACATTGAAGATAGAA
 TGCGTGGAAATATTAAGACCAAAGCAAAACCCAGGTGTCTTCCACTGTCTATTGAAGGTCATGT
 TGACTATCTGATCAAGGAGGCCACAGATGAAACCAATTTATGTGCTATGTACATTGGTTGGGCT
 GCTTTCATGTGA

XPA-1

ATGTCTTCAAATCACAACTACATTAACAGAAGAACAAAAGCCAGAATAGAGCAAAACAAAA
 AAAAAGCTTTGCTTCTTAAGAAGGCAAGGTAACCAAACGTCCCATGAGGAAGGGCCATCCAG
 TGATATTGAGAGTAAAATTCATTGGACTCCACTGGAGATTGACACAAGAGCTGGATTCTTTTTA
 GAAGATGTGGATACAAAAACAACAAAAACAGATAGTATAAAGATCATTTCATGAACCAGGTCCAC
 TGATTGAAAGTAATTTAGTGTGTGAAGAATGCCAATGAAATTTCAAGATTCACTACTTATACAA
 CAAATTTGATCAACCAGTGTGTGATAGTTGTCGCGATGATGAAAAACATTCTCTTATCACAAGA
 ACAGATGCAAAGAGCAATTATTTATTAAAAGATGAAGATTTTGATAAAAGAGAGCCTCCATTAA
 AATATATCTTAAGAAAAAATCCACACAATCCAAAATGGGGAGATATGAACTTTATCTTCAAAG
 TCAGATTTGGAAACGAGTTATGGAAGTGTGGGAAGTGAGGAAAAGCTGGAGGAGGCTAGAGAA
 GAAAGGGCTGCTAAAAAAGAGAAGACAAAAAATAATGATAAAAAATTAAGAAGATTAC
 GCATGTCAGTAAGGAGTAGCTTGTGGCGGAAAGATCTCTCAGGTCATCAACATGAGTATGGTGA
 TGAGGTTTATGATGAAGATAAAGATAGCTATTCTAAGACTTGTTCATCTTGTGGTCATGAGTGG
 ACATATGAAAAAATGTAA

XRCC-2

ATGGCAATCGATTACGAAAAGCACTGAAAAAGCAGAATCAGGAGCACAGTTGCTTGCTAGAT
 TGAGTACCCGACCAGACTTAACACCAGTTGACCCATTTGTTTTTGGAAATTTTTCTTCTCATGG
 ATCCACCTGCTTCGGTCAAGTGGTAGAGCTGTATGGGCCTGAGGGTAGTGGGAAATCAGAACTT
 GCTCTTCATTACATCGCAAAGACTTGTCTGCCTACTCAGTGGAAAGGTTATCCTCTTGGTGGTC
 TTGGTGCCAAAGTTATTTTTATTGACACGGAATACAAGTTTTCAATTCTAAGACTTGCGATTGT
 TATAGAAAAATTGTTTTTTCAGAGATAGTACAGCAAGGCTCCTCTTCCAAGAGGGTATCAAACCAA
 ACTAAATGTGAAGCTTGTGTAGAAGACATTAGCGCTCTTGATAGATCTGACTCATGCAAGAATG
 GATATGTTGAAGTCAAAGCTGCAGTGCATCAGACAGTTTAAAGCAGTGTAACATAAAAAACAT
 GTCAAAAACAAATCTAACTTATCAACATGGTGAATGGTGCATACAAAAGGGAGGTACGCCA
 GATTTATCCGAAGTGAAGGAACTATACAGCCACAGAAAGAACTGCAACTCTATTGCTAC
 AAGAGACAGATGAAGTTGTAAGTACTAGATGCCCTTGGGCGTGTTCAAGTGAATCAAGGTCCAAAGCAC
 TCAGCAACTTCTGGCCACGCTTCTATCTCTGGAACATGCACTGTCCAGCGAGCCACAAC TAGCC
 CTTGTGTCATTGACACCATCTCAGCTTCTACTGGTTGGACAAAGCCTTAGACCCCAGCAACT
 TCCACAGCACTGAGGTGAAAAATGGCACCATTGTTAACGCCATATCTAAGTACGTCTCTGAGCT
 TGGTGTTCCTTTCTTGTGTTCAAGGAGGACGTCATAGGGAAAAAGAAAAATTGGAACGACAAG
 GAGTGCAGGTACAGCAAGAGTGAAGGTTCCAAACAGTCGGAGAAAGAAAAAGTTTTGTCTGAGC
 ATGTTCCGTATTTGGGTAGGTCGTGGGAAAGTTTTCCGGTCAAGAGGATTGTGTTGACGAAACA
 TTCAGACGTGAAGGACAGGAAGTTGTTGACTGCCTGGTGTTCAGACTGGCCCAATGGAAGGCGT
 TTTGTGTTTGTGGATGATGGCATTAAAGTTTCTTTAA

XRCC-4

ATGGCCTCTGAAAGAGAAGAGACTTCACTTTTAGAATTCACAGACCAGCCTTGTAAGGGGGACA
GAAGCTTCTGTGGACCATTATGAAAACGAAGAAGAAGAAAGCTTTGATTTACACTTCTTAG
TGGACAGAGTGTCTGGGAGGGATCATTATCATTAAAGGACATGAAGCAACAAAGTGATGAAATA
CGGATGGATTTAAGTCCCTTCATAGATAATGCCAAAGCTGCATTTCTACAAGATGGTGAATCTT
CTACTTTCCAGTGTACTTTATCAAACAGCAAAAAAGATTCTATATTGCTAAGTTGGAAAAAGCA
GTCAGAGGATGTTAAATTTAAATTAGGGTCACTGATGTTAAAGAAATGTGAGAACTCATCTTCC
AAAATCTGTGATATTTTGAGTGATTGTGTAACCCGCCTAAATTCCTTGCATTCTATGAAATTGG
AAAATCAAAGATTAAGTATAGAAAAGACAAAATGCAATCAAGAAATTAGAAAAATGTGTTCAAGC
AAAGGAGGAACCTGAAAAGAATCTTTATTCTAAGTTTGTGTCAGTTTTAAATAGCAAAAAAGAG
AAAATCCGTGAATTAGAAAATAATGACCATGAAGAGCAAGAAATTGTAGAAAAGATTTAGAGC
CAGTAAAAAGAAAAGTGACAGAGACTTACTCAGTATTTCTACAAAAAAGTTAAATCCAAAAG
GGATGAAACACCTCCAGATCTTGATTCTTCACTAAACCTTGACATTGACCAAACAGAAGAGAGA
AATAATCCAATTGTGATTAGGAGTCGAGCAATAACACAAACAAGAAAAGGAGCATCATCCAAAC
TAATTTTACCAACAGTTTCCACTAACAGTTCAGTCAATCTTCAGAGAAAGTCAAGCTTGAGGAA
GAGTGGTTCCAATAAATCATCTGACAATTTGGATCCAGAGGATTTGTTAGATAATTTTTAG

ANEXO II

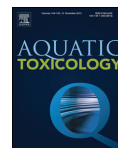
Artículos científicos publicados y directamente relacionados con el presente trabajo:

- **Aquilino, M.**, Sánchez-Argüello, P., Martínez-Guitarte, J L., [2016]. Vinclozolin alters the expression of hormonal and stress genes in the midge *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology* 174. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.001>.
- **Aquilino, M.**, Sánchez-Argüello, P., Martínez-Guitarte, JL., [2018]. Genotoxic effects of vinclozolin on the aquatic insect *Chironomus riparius* [Diptera, Chironomidae]. *Environmental Pollution* 232, 563–570. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.088>.
- **Aquilino, M.**, Sánchez-Argüello, P., Novo, M., Martínez-Guitarte, JL., [2019]. Effects on tadpole snail gene expression after exposure to vinclozolin. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 170, 568–577. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.015>.



Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

Vinclozolin alters the expression of hormonal and stress genes in the midge *Chironomus riparius*

Mónica Aquilino^a, Paloma Sánchez-Argüello^b, José-Luis Martínez-Guitarte^{a,*}^a Grupo de Biología y Toxicología Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, UNED, Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain^b Laboratorio de Ecotoxicología, Departamento de Medioambiente, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ctra. La Coruña km 7, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 January 2016

Received in revised form 1 March 2016

Accepted 2 March 2016

Available online 4 March 2016

Keywords:

Fungicide

Endocrine disruption

Midge

Stress

ABSTRACT

Vinclozolin is a fungicide used in agriculture that can reach aquatic ecosystems and affect the organisms living there. Its effects have been intensively studied in vertebrates, where it acts as an antiandrogen, but there is a lack of information about its mechanistic effects on invertebrates. In this work, we analyzed the response of genes related to the endocrine system, the stress response, and the detoxification mechanisms of *Chironomus riparius* fourth instar larvae after 24 h and 48 h exposures to 20 (69.9 nM), 200 (699 nM), and 2000 µg/L (6.99 µM) of Vinclozolin. Survival analysis showed that this compound has low toxicity, as it was not lethal for this organism at the concentrations used. However, this fungicide was shown to modify the transcriptional activity of the ecdysone response pathway genes *EcR*, *E74*, and *Kr-h1* by increasing their mRNA levels. While no changes were observed in *disembodied*, a gene related with the ecdysone synthesis metabolic pathway, *Cyp18A1*, which is involved in the inactivation of the active form of ecdysone, was upregulated. Additionally, the expression of two genes related to other hormones, *FOXO* and *MAPR*, did not show any changes when Vinclozolin was present. The analysis of stress response genes showed significant changes in the mRNA levels of *Hsp70*, *Hsp24*, and *Gp93*, indicating that Vinclozolin activates the cellular stress mechanisms. Finally, the expressions of the genes *Cyp4G* and *GstD3*, which encode enzymes involved in phase I and phase II detoxification, respectively, were analyzed. It was found that their mRNA levels were altered by Vinclozolin, suggesting their involvement in the degradation of this compound. For the first time, these results show evidence that Vinclozolin can modulate gene expression, leading to possible significant endocrine alterations of the insect endocrine system. These results also offer new clues about the mode of action of this compound in invertebrates.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Vinclozolin (Vz; [3-(3,5-dichlorophenyl)-5-methyl-5-vinylloxazolidine 2,4-dione]) is a widely used fungicide that has been classified by the European Chemical Agency as toxic to aquatic life with long lasting effects, and its use was formally unauthorized in Europe in 2007 but it is still used in other countries. It was found in groundwater at concentrations ranging from 60 to 220 ppb and in surface water from 128 to 390 ppb (El-Shahat et al., 2003). It is classified as a possible human carcinogen (Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential, Office of Pesticide Programs, U.S. Environmental Protection Agency), as unlikely to present acute hazard in normal use (The WHO recommended classification

of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004, WHO), and has been described as an antiandrogen in vertebrates with additional transgenerational effects because it alters the epigenome (Casati et al., 2015; Paoloni-Giacobino, 2014; van Ravenzwaay et al., 2013; Skinner and Anway, 2007). Although it has been intensively studied in vertebrates, information concerning its effects on invertebrates is still scarce. It is known that Vz does not affect the survival nor the reproduction of *Daphnia magna* at environmental concentrations, but this compound shows some effects related to its development (Haeba et al., 2008; Vandegehuchte et al., 2010). It also affects the development and reproduction of isopods (Lemos et al., 2009, 2010a, 2010b, 2010c). Previous research has indicated that this fungicide may alter the reproduction of mollusks. Tillmann et al. (2001) described the earlier sexual response and the stimulation of egg mass production in *Marisa cornuarietis* due to Vz (Lagadic et al., 2007). Furthermore, lower fecundity, which can be attributed to Vz, has been

* Corresponding author.

E-mail address: jlmartinez@ccia.uned.es (J.-L. Martínez-Guitarte).

1 **Vinclozolin alters the expression of hormonal and stress genes in the**
2 **midge *Chironomus riparius***

3 Mónica Aquilino¹, Paloma Sánchez-Argüello², José-Luis Martínez-Guitarte*¹

4 ¹Grupo de Biología y Toxicología Ambiental. Facultad de Ciencias. Universidad
5 Nacional de Educación a Distancia, UNED. Senda del Rey 9, 28040 Madrid.
6 Spain.

7 ² Laboratorio de Ecotoxicología. Departamento de Medioambiente, Instituto
8 Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ctra. La
9 Coruña km 7, 28040 Madrid, Spain.

10 *Corresponding author: Dr. José-Luis Martínez-Guitarte, Facultad de Ciencias.
11 UNED. Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain. Telephone: +34913987644. E-
12 mail: jlmartinez@ccia.uned.es

13 **Keywords:** fungicide, endocrine disruption, midge, stress.

14

15 **ABSTRACT**

16 Vinclozolin is a fungicide used in agriculture that can reach aquatic ecosystems and
17 affect the organisms living there. Its effects have been intensively studied in
18 vertebrates, where it acts as an antiandrogen, but there is a lack of information about
19 its mechanistic effects on invertebrates. In this work, we analyzed the response of
20 genes related to the endocrine system, the stress response, and the detoxification
21 mechanisms of *Chironomus riparius* fourth instar larvae after 24h and 48h exposures to
22 20 (69.9 nM), 200 (699 nM), and 2000 µg/L (6.99 µM) of Vinclozolin. Survival analysis
23 showed that this compound has low toxicity, as it was not lethal for this organism at the
24 concentrations used. However, this fungicide was shown to modify the transcriptional
25 activity of the ecdysone response pathway genes *EcR*, *E74*, and *Kr-h1* by increasing
26 their mRNA levels. While no changes were observed in *disembodied*, a gene related
27 with the ecdysone synthesis metabolic pathway, *Cyp18A1*, which is involved in the
28 inactivation of the active form of ecdysone, was upregulated. Additionally, the
29 expression of two genes related to other hormones, *FOXO* and *MAPR*, did not show
30 any changes when Vinclozolin was present. The analysis of stress response genes
31 showed significant changes in the mRNA levels of *Hsp70*, *Hsp24*, and *Gp93*, indicating
32 that Vinclozolin activates the cellular stress mechanisms. Finally, the expressions of
33 the genes *Cyp4G* and *GstD3*, which encode enzymes involved in phase I and phase II
34 detoxification, respectively, were analyzed. It was found that their mRNA levels were
35 altered by Vinclozolin, suggesting their involvement in the degradation of this
36 compound. For the first time, these results show evidence that Vinclozolin can
37 modulate gene expression, leading to possible significant endocrine alterations of the
38 insect endocrine system. These results also offer new clues about the mode of action
39 of this compound in invertebrates.

40

41 1. INTRODUCTION

42 Vinclozolin (Vz; [3-(3,5-dichlorophenyl)-5-methyl-5-vinyloxazolidine 2,4-dione])
43 is a widely used fungicide that has been classified by the European Chemical
44 Agency as toxic to aquatic life with long lasting effects, and its use was formally
45 unauthorized in Europe in 2007 but it is still used in other countries. It was found
46 in groundwater at concentrations ranging from 60 to 220 ppb and in surface
47 water from 128 to 390 ppb (El-Shahat et al., 2003). It is classified as a possible
48 human carcinogen (Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential, Office of
49 Pesticide Programs, U.S. Environmental Protection Agency), as unlikely to
50 present acute hazard in normal use (The WHO recommended classification of
51 pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004, WHO), and has
52 been described as an antiandrogen in vertebrates with additional
53 transgenerational effects because it alters the epigenome (Casati et al., 2015;
54 Paoloni-Giacobino, 2014; van Ravenzwaay et al., 2013; Skinner and Anway,
55 2007). Although it has been intensively studied in vertebrates, information
56 concerning its effects on invertebrates is still scarce. It is known that Vz does
57 not affect the survival nor the reproduction of *Daphnia magna* at environmental
58 concentrations, but this compound shows some effects related to its
59 development (Haeba et al., 2008; Vandegehuchte et al., 2010). It also affects
60 the development and reproduction of isopods (Lemos et al., 2009, 2010a,
61 2010b, 2010c). Previous research has indicated that this fungicide may alter the
62 reproduction of mollusks. Tillmann et al. (2001) described the earlier sexual
63 response and the stimulation of egg mass production in *Marisa cornuarietis* due
64 to Vz (Lagadic et al., 2007). Furthermore, lower fecundity, which can be
65 attributed to Vz, has been observed in the pond snail *Lymnaea stagnalis*

66 (Ducrot et al., 2010) exposed to a range of 0.025 µg/L to 2.5 mg/L (0.087 nM -
67 8.7 µM). Additionally, the hatchability of the freshwater snail *Physa acuta* was
68 reduced by 10 mg/L (34.9 µM) Vz exposure (Sánchez-Argüello et al., 2012).
69 Little data at the cellular level has been obtained. Only studies analyzing the
70 effects of this compound on the DNA methylation of *Aedes albopictus* (Oppold
71 et al., 2015) and *Daphnia magna* (Vandegheuchte et al., 2010) and its
72 genotoxic effects in *Physa acuta* (Sánchez-Argüello et al., 2012) have been
73 carried out.

74 *Chironomus riparius* is a dipteran with aquatic larvae that have a key role in
75 freshwater ecosystems (Rieradevall M et al., 1995). This organism is used in
76 several toxicity tests (OECD, 2004a, 2004b, 2010, 2011). It has been employed
77 to analyze the cellular and molecular effects caused by several compounds,
78 such as bisphenol A (Lee and Choi, 2007; Planelló et al., 2008), phthalates
79 (Herrero et al., 2015; Planelló et al., 2011), heavy metals (Planelló et al., 2007),
80 UV-filters (Ozáez et al., 2013, 2014), and pesticides (Martínez-Paz et al., 2013;
81 Morales et al., 2014), showing that the genes related to the endocrine system
82 and the stress response as well as detoxification enzymes could potentially be
83 used as biomarkers to characterize the mode of action of these compounds and
84 as tools to improve the environmental risk assessment of these pollutants. The
85 endocrine system of insects is one of the best known systems in invertebrates.
86 Ecdysone is the main hormone in insects and regulates the development and
87 ecdysis (Nation, James L., 2008). Its synthesis is carried out by a set of Cyp450
88 enzymes that are known as the Halloween set of genes (Gilbert, 2004; Iga and
89 Kataoka, 2012). After the hormone has accomplished its function, it is
90 inactivated by another Cyp450 enzyme, Cyp18A1 (Guittard et al., 2011). On the

91 other hand, insects have an insulin-signaling pathway (Garofalo, 2002), in which
92 the response to insulin-like peptides are activated by a set of proteins that is
93 involved in growth and other physiological events (Goberdhan and Wilson,
94 2003; Leever, 2001; Wu and Brown, 2006). Forkhead box sub-group O
95 (FOXO), a transcription factor involved in the regulation of the number of cells,
96 participates in this pathway (Neufeld, 2003; Wu and Brown, 2006). Although the
97 insect endocrine system is one of the best known in invertebrates, there are still
98 many receptors that have no identified ligands, such as the estrogen-related
99 receptor, which has been studied in relation to the endocrine disruption activity
100 of different compounds (Liu et al., 2014; Morales et al., 2013, 2014).

101 Another cellular process that has been studied to elucidate the mode of action
102 of the pollutants is the stress response, which is mainly characterized by
103 increased levels of heat shock proteins (Morimoto et al., 1997). These proteins
104 work during stress to prevent the unfolding and aggregation of cellular proteins,
105 but they also participate in other physiological processes, such as apoptosis,
106 the cell cycle and division, development, and differentiation (Bakthisaran et al.,
107 2015; Didelot et al., 2006; Morrow et al., 2015; Yang and Li, 2005). They are
108 divided into several families, and Hsp70 has been found to be an important
109 member. Changes in the levels of the mRNA and/or protein of Hsp70 have
110 been studied in a great number of organisms under a variety of conditions
111 (Carnevali and Maradonna, 2003; Chen et al., 2014; Lin et al., 2014; Planelló et
112 al., 2008), showing that this protein could be useful in environmental toxicology.

113 The presence of compounds inside the cell activates the mechanism to
114 deactivate and eliminate them. It is a two-step process. The first step typically

115 involves an oxidative reaction by a cytochrome P450 monooxygenase enzyme,
116 while the second step consists of a conjugation with a charged species, such as
117 glutathione (GSH), sulfate, glycine, or glucuronic acid, to increase the polarity of
118 the compound (Iyanagi, 2007). In *Chironomus riparius*, *Cyp4G* (Martínez-Paz et
119 al., 2012) and thirteen GST enzyme genes (Nair and Choi, 2011; Nair et al.,
120 2011) have been analyzed in the presence of different pollutants, showing that
121 their expression can be modulated by contaminants and suggesting that they
122 could be good parameters to evaluate the detoxification response to toxicants.

123 As there is a lack of data concerning the effects of vinclozolin in *Chironomus*
124 *riparius*, we studied the response of fourth instar larvae to this compound. The
125 survival and expression profile of genes related to the endocrine response
126 (*EcR*, *E74*, *Kr-h1*, *FOXO*, *MAPR*), ecdysone metabolism (*disembodied*,
127 *Cyp18A1*), stress response (*Hsp70*, *Hsp24*, *Gp93*), and detoxification
128 mechanisms (*Cyp4G*, *GstD3*) were analyzed in order to determine whether
129 vinclozolin alters the cellular homeostasis and disrupts the endocrine system.
130 The obtained data also could provide a deeper knowledge about the mode of
131 action of this compound in an important link of the aquatic food web and,
132 additionally, add new molecular biomarkers to establish the effects that other
133 compounds could show on invertebrates.

134 **2. MATERIAL AND METHODS**

135 **2.1. Animals**

136 The experimental animals were aquatic larvae of the midge *Chironomus*
137 *riparius*. Stock cultures are maintained in the laboratory of Biology and

138 Environmental Toxicology (UNED) from natural populations of midge larvae
139 originally collected in a non-polluted area of Valencia (Spain) and reared under
140 standard laboratory conditions according to OECD guidelines (OECD, 2001).
141 Larvae were grown from egg masses in aqueous culture medium (0.5 mM
142 CaCl_2 , 1 mM NaCl, 1 mM MgSO_4 , 0.1 mM NaHCO_3 , 0.025 mM KH_2PO_4 , and
143 0.01 mM FeCl_3) supplemented with nettle leaves, commercial fish food
144 (TetraMint), and cellulose tissue in polyethylene tanks. Cultures were
145 maintained under constant aeration at 20°C and under standard light-dark
146 periods (16L:8D).

147 **2.2. Treatment**

148 Vinclozolin (Vz; CAS No.A 50471-44-8, purity \geq 99%) was purchased from
149 Sigma-Aldrich (Germany). Experimental treatments were carried out by
150 exposing fourth instar larvae (three different experiments of $n = 50$ in the
151 survival experiments, $n = 10$ in the expression analysis per vessel) to the
152 chemical diluted in 50 ml culture medium without sediment. Glass vessels were
153 used to carry out the exposures. The duration of the treatment varied depending
154 on whether the exposures were for survival (up 96 h) or expression analysis (up
155 to 48 h). In the tests for survival, the medium was renewed every day to
156 maintain the steady state of exposure of the parent compound because the half-
157 life of Vz in the test medium was 10.8 h (Sánchez-Argüello et al., 2012). On the
158 other hand, Ducrot et al. (2010) describe a maximal VZ concentration detected
159 in surface water of 0.5 $\mu\text{g/L}$ (1.75 nM) and an impairment of invertebrate
160 reproduction at 2.5 mg/L (8.7 μM) so the following nominal concentrations of Vz
161 were used: 20, 200 and 2,000 $\mu\text{g/L}$ (69.9 nM, 0.699 μM , and 6.99 μM)

162 respectively). Three independent experiments were performed. The untreated
163 control larvae were exposed to the same concentration of solvent (acetone
164 0.1%).

165 **2.3. Identification of gene sequences and primers**

166 The *Cyp4G*, *Hsp24*, and *Hsp70* genes were described by our laboratory
167 (Martínez-Paz et al., 2012; Martín-Folgar et al., 2015; Morales et al., 2013),
168 while *EcR* and *GstD3* were described previously (Nair and Choi, 2011, 2011).
169 However, several of the genes used in this work had not been previously
170 described in *Chironomus riparius*. To obtain their mRNA sequences, we used a
171 NGS project present in the database, performed with a mix of individuals from
172 different developmental stages and larvae exposed to cadmium, copper,
173 tributyltin, and phenanthrene (Marinković et al., 2012). A systematic search
174 using the raw sequences from this project and the sequences that the authors
175 uploaded to the Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) allowed us to obtain
176 the sequences that matched with *cytochrome P450 18A1 (Cyp18A1)*,
177 *disembodied (Dib)*, transcription factor *E74 (E74)*, *forkhead box sub-group O*
178 *(FOXO)*, *glycoprotein 93 (Gp93)*, *Krüppel homolog 1 (Kr-h1)*, and *membrane*
179 *associated progesterone (steroid) receptor (MAPR)* from other insects. We
180 named this last gene “membrane associated progesterone receptor” because
181 this is the name that has been assigned to its homologous protein sequence in
182 *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*, but it is also known as “membrane
183 steroid binding protein” in *Drosophila melanogaster*. Table 1 summarizes the
184 sequences that correspond to each mRNA and the closest matching *Drosophila*
185 *melanogaster* protein. The primers used for Real-Time PCR were designed

186 using these sequences and are shown in table 2. The design of these primers
187 was carried out with NCBI primer designing tool
188 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

189 **2.4. RNA isolation**

190 The total RNA was extracted from each control and individual fourth instar
191 larvae that were exposed to Vz using a guanidine isothiocyanate-based method
192 performed with a commercial kit (TRIZOL, Invitrogen) according to the
193 manufacturer's protocol. Afterwards, the RNA was treated with RNase-free
194 DNase (Roche) and, subsequently, a phenol:chlorophorm:isoamil alcohol
195 (Fluka) extraction using Phase Lock Light tubes (5prime) was carried out. The
196 quality and quantity of the total RNA were determined by agarose
197 electrophoresis and absorbance spectrophotometry (Biophotomer Eppendorf).
198 Finally, the purified RNA was stored at -80°C.

199 **2.5. cDNA synthesis and Real time (RT-PCR)**

200 Aliquots of 0.5 µg of isolated RNA were reverse-transcribed using 100 units of
201 M-MLV enzyme (Invitrogen) in the presence of 0.5 µg of the oligonucleotide
202 dT20 primer (Sigma) and 0.5 mM dNTPs (Biotools) at 37°C for 50 min in a final
203 reaction volume of 20 µl. The cDNA obtained was used as the template for
204 Polymerase Chain Reaction (PCR). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was
205 performed with a CFX96 thermocycler (BioRad) and SsoFast EvaGreen
206 Supermix (BioRad). The glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)
207 and ribosomal protein L13 (rpL13) genes were employed as endogenous
208 references controls (Morales et al., 2013).

209 The PCR efficiency was assessed using a standard curve with the template
210 diluted 1:2 in five steps and with the same PCR conditions ($R_2 > 0.98$ for all
211 primers). The efficiencies are listed in Table 2. The qRT-PCR was run using the
212 following cycling conditions: an initial denaturation at 95°C for 30 seconds,
213 followed by 39 cycles of 95°C denaturation for 5 seconds, 58°C annealing for 15
214 seconds and 65°C elongation for 10 seconds. To verify the accuracy of each
215 amplicon, a melting curve analysis was performed after amplification. The
216 BioRad CFX Manager 3.1 software was used to determine the total mRNA
217 levels by normalizing the gene expression ($2^{-\Delta C_q}$) against two endogenous
218 reference genes. Each sample was run in duplicate wells, and three
219 independent replicates were performed for each experiment.

220 **2.6. Statistical analysis**

221 Statistical analyses were performed using SPSS 22 (IBM). The normal
222 distribution and variance homogeneity of data were assessed with the
223 Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. For normally distributed
224 data significant differences were compared using Anova (*Cyp4G*, *GstD3*, *Dib*,
225 *EcR*, *MAPR*) while Kruskal-Wallis was used for non-normally distributed data
226 (*Cyt18a1*, *E74*, *Krh-1*, *Hsp24*, *Hsp70*, *Gp93*). A significance level of $p \leq 0.05$ (*)
227 was used. All of the results are expressed as the mean and standard error of
228 mean (SEM) of individual fourth instar *C. riparius* larvae from three experiments,
229 discarding the higher- and lower-valued results obtained in the control and
230 vinclozolin treatments ($n=7$).

231 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

232 **3.1. Effects of vinclozolin on larvae survival**

233 Survival analysis with fourth instar larvae of vinclozolin toxicity showed that this
234 compound had no effect on the survival of *C. riparius* larvae (figure 1). The
235 mortality rate was similar to that observed for the control larvae, even at the
236 highest concentration tested (2,000 µg/L). From these results, it can be
237 concluded that vinclozolin has a low toxicity and that these concentrations were
238 suitable to perform short-term expression studies. This low toxicity agrees with
239 previous results found for invertebrates. Most of the studies performed to date
240 have focused on the sublethal effects of Vz (Ducrot et al., 2010; Lemos et al.,
241 2010c; Sánchez-Argüello et al., 2012; Tillmann et al., 2001; Vandegehuchte et
242 al., 2010; Wu et al., 2014). Thus, this compound has low toxicity and
243 environmental concentrations could have an impact on the survival of larvae but
244 no so strong that compromise the viability of the population.

245 **3.2. Effects of vinclozolin on endocrine related genes**

246 Vinclozolin is a fungicide with known antiandrogen activity in vertebrates, but its
247 action in invertebrates is poorly understood. There is a lack of studies
248 concerning the effects of Vz in invertebrates, and few studies are focused on
249 the molecular endpoints that help to describe its mode of action. The endocrine
250 system involves a number of interactions between different hormonal pathways
251 and Vz could affect some of them. Although the presence of androgens and
252 other sex steroids similar to those found in vertebrates has been detected in
253 some invertebrates, mainly mollusks, there is still a debate regarding its
254 biological role (Scott, 2012, 2013). However, no androgens have been
255 described in insects but one of the main hormones in them, ecdysone, has a

256 steroid-like nature. We selected several genes to evaluate the ability of Vz to
257 alter the endocrine system analyzing the expression of genes involved in the
258 ecdysone response pathway (*EcR*, *E74*, *Kr-h1*), the ecdysone metabolism (*Dib*,
259 *Cyp18A1*), or the insulin receptor pathway (*FOXO*). Additionally, an orphan
260 receptor (*MAPR*) that can bind steroids was used (Kimura et al., 2012).

261 Initially we analyzed the ecdysone response pathway using fourth instar larvae
262 treated with 20 and 200 µg/L of Vz for 24 and 48 h. Real-time PCR analysis
263 showed that exposure of 20 µg/L Vz for 24 h increased the mRNA levels of
264 *EcR*, with a return to similar levels of those observed in the control at 48 h. No
265 significant increase was observed with 200 µg/L of Vz exposure (figure 2).
266 When the expression levels of *E74* and *Kr-h1* were analyzed, no changes were
267 detected at 24 h at any concentration of Vz, but an increase at 48 h can be
268 observed with 20 µg/L of Vz exposure (figure 2). This agrees with the fact that
269 these genes encode for proteins that are activated by the cascade initiated by
270 ecdysone binding to EcR. In insects, there are no reports that indicate the
271 presence of sex steroids, but ecdysone is an important hormone with a steroid-
272 like nature. The analysis performed showed that *EcR* was upregulated and that
273 two genes that encode proteins that are activated later in the ecdysone
274 response pathway, *E74* and *Kr-h1*, were also activated by a 20 µg/L exposure
275 of Vz but 24 h later than *EcR*. This sequential activation suggests that Vz is
276 mimicking ecdysone and induces the downstream steps of the ecdysone
277 response pathway. Then, it can be said that Vz has endocrine disrupting activity
278 in insects and it is affecting an endocrine pathway related with the ecdysis and
279 the development.

280 On the other hand, the action of xenobiotics also can affect the metabolism of
281 the hormones. To check this possibility, we analyzed the expression of two
282 genes, *disembodied* and *cytochrome P450 18A1*, that encode for enzymes
283 implicated in the synthesis and the inactivation of ecdysone (Guittard et al.,
284 2011; Rewitz et al., 2006). *Disembodied* is a cytochrome P450 enzyme, also
285 known as *Cyp302a1*, involved in ecdysone synthesis, while *Cytochrome P450*
286 *18a1* participates in the inactivation of the active form of the hormone. When the
287 expression analysis of these genes was performed, no changes were detected
288 for *Dib*, but an increase in the expression of *Cyp18A1* was detected at 48 h for
289 the 20 µg/L exposure (figure 3). This result suggests that the presence of Vz did
290 not affect the synthesis of ecdysone but stimulated its degradation pathway.
291 Thus, the increased expression of *Cyp18A1* could reflect the increased activity
292 of the inactivation mechanism for the natural hormone as a result of the
293 activation of the ecdysone response pathway observed at the same time. There
294 are no previous studies that report a variation in the metabolism of hormones,
295 even in vertebrates, in which the mode of action of antiandrogens has been
296 associated with the androgen receptor (Kavlock and Cummings, 2005). To our
297 knowledge, this is the first time that the interference of Vz with a gene related to
298 the metabolism of a hormone has been described, suggesting that it could
299 affect the endocrine system in very diverse ways. However, it cannot be
300 discarded that this effect is indirect although it seems specific. While *Dib* is not
301 affected, *cyp18a1* upregulation could be a result of a general effect of the
302 overexpression of cytochrome P450 enzymes because it has been described
303 that Vz can alter this type of enzyme in vertebrates (de Oca et al., 2015; Ronis
304 et al., 1998). In this sense it is important to consider the great number of

305 cytochrome P450 enzymes that are present in the cells so a diversity in the
306 response to Vz could be possible. Further research is needed to clarify whether
307 Vz can also interfere also with hormonal metabolism.

308 On the other hand, at the present time, there are no data about the effect that
309 this compound could have on other hormonal pathways in vertebrates or
310 invertebrates, and it is only proposed to interfere with the androgen response
311 pathway (Wilson et al., 2008) at the endocrine level. It is important to elucidate
312 whether Vz could modulate other hormonal responses because it could cause a
313 wider effect than previously thought, at least in invertebrates. To analyze other
314 hormonal response pathways, two other genes were studied. *FOXO* is a gene
315 related to the insulin-like peptide response pathway. Its transcription was
316 activated at 48 h when larvae were exposed to 20 µg/L of Vz, but no other
317 response was observed (figure 4). Additionally, the expression of a gene that
318 encodes an orphan receptor that could bind steroids, *MAPR*, was analyzed. For
319 this gene, no significant changes were detected in mRNA levels (figure 4).
320 Expression analysis of *FOXO* indicates that Vz can also affect other hormonal
321 pathways, but the mechanisms are still unclear. Again, it cannot be discarded
322 that the alteration is produced indirectly because this compound can also
323 modulate epigenetic processes (Oppold et al., 2015). Thus, it is possible that
324 the alteration of epigenetic marks can modify the expression of certain genes in
325 response. *MAPR*, a gene that encodes for a receptor with an unknown ligand in
326 insects but probably could bind a steroid (Kimura et al., 2012), did not show
327 changes in its transcriptional activity. Thus, it is most likely that this receptor is
328 not affected by Vz. Despite this negative result, it is necessary to highlight the
329 importance of studying orphan receptors because they may work with endocrine

330 disruptors to affect the insect endocrine system. Finally, the effects of Vz on
331 other hormonal pathways is important because there are complex relations
332 among them and it is possible that the observed effects of this compound are
333 indirectly produced.

334 One striking fact is that the upregulation of endocrine related genes is observed
335 with the lowest concentration tested, but no response is observed with the
336 highest concentration. It is possible that the 200 µg/L concentration causes the
337 response to occur at earlier times, even before 24 h. It is a ten-fold higher
338 concentration. Thus, it cannot be discarded as the fastest response induction.
339 However, there is another explanation that fits with the characteristics of the
340 hormonal responses. Nonmonotonic dose responses for several hormones
341 (Vandenberg et al., 2012; Welshons et al., 2003), where low doses are
342 physiologically relevant, but higher doses do not activate the hormonal action,
343 have been described. This type of response, also known as inverted-U, has
344 also been observed with different xenoestrogens.

345 **3.3. Effects of vinclozolin on stress response**

346 It has been previously described that Vz activates the stress response in
347 *Porcellio scaber* and *Hyalella azteca* (Lemos et al., 2010a; Wu et al., 2014), but
348 there are no data focusing on the effects of Vz on the heat shock proteins
349 genes response in insects. To test the response of these genes in *C. riparius*,
350 we analyzed the expression of *Hsp24*, *Hsp70*, and *Gp93*, three genes that
351 encode for members of the heat shock protein family. The analysis of the Real-
352 time PCR data (figure 5) showed that all of these genes did not show any
353 change at 24 h with the concentrations tested, but a higher transcriptional

354 activity was observed at 48 h, although only 20 µg/L of Vz produced statistically
355 significant increases. Apparently, the activation is not dose-dependent because
356 no statistically significant increase was observed with the 200 µg/L exposure.
357 The three genes analyzed cover different types of HSPs. *Hsp24* is a small HSP,
358 and this group of HSPs has been associated with a wide number of roles in
359 cells (Bakthisaran et al., 2015; Morrow et al., 2015), including development.
360 Thus, the alteration caused by Vz could be indirectly related with the effect that
361 this compound has as endocrine disruptor. On the other hand, *Hsp70* is the
362 main HSP gene related to the stress response, and it is also altered by Vz in *P.*
363 *scaber* (Lemos et al., 2010a). Thus, this compound may activate the stress
364 response. However, it is worth noting that some heat shock proteins are
365 associated with the complex of activators and repressors that, when interacting
366 with nuclear receptors, contribute to steroid hormone signaling inside cells
367 (Arbeitman and Hogness, 2000; Gehring, 1998). *Gp93* is a gene that encodes a
368 protein related to Hsp90 because it is the ortholog of glucose regulated protein
369 94 (GRP94) (Maynard et al., 2010) and the endoplasmic reticulum Hsp90, a
370 metazoan-restricted chaperone that is essential for early development in
371 mammals (Chen et al., 2006). No previous data exist concerning the effect that
372 Vz has on this gene, but it has been previously described that Vz affects the
373 expression of glucose regulated protein 78 (GRP78) (Lemos et al., 2010a), a
374 gene related to the Hsp70 family. The glucose regulated proteins (GRPs) are
375 traditionally regarded as ER proteins with chaperone and calcium binding
376 properties. They are constitutively expressed at basal levels in all organs, and
377 as stress-inducible ER chaperones, they are major players in protein folding,
378 assembly, and degradation (Marzec et al., 2012; Zhang and Zhang, 2010). It is

379 interesting that GRP94 has also been found to be involved in the regulation of
380 insulin-like growth factor secretion in mice (Wanderling et al., 2007), so the
381 transcriptional activity increase of *Gp93* by Vz in *C. riparius* could be related in
382 some way to the activation of the *FOXO* gene because they seemed to be
383 coordinated. Overall, the obtained results indicate that several heat shock
384 protein genes are activated in presence of Vz and this activation would be
385 related with their roles in stress and/or development.

386 **3.4. Effects of vinclozolin on detoxification genes**

387 Usually, it is believed that detoxification mechanisms involve two steps, phase I
388 and phase II, which are carried out by the actions of cytochrome P450 enzymes
389 for phase I and transferases with a diverse nature for phase II. It has been
390 described that Vz alters the cytochrome P450 enzymes in vertebrates (de Oca
391 et al., 2015), but there is a lack of data regarding its effects in invertebrates,
392 although it has been observed that it can upregulate some genes, such as
393 hemocyanine, cytochrome c oxidase, and cytochrome b, in invertebrates (Wu et
394 al., 2014). We analyzed the effects of Vz on the expression of the genes related
395 to these detoxification mechanisms by probing the changes in the mRNA levels
396 of *Cyp4G* and *GstD3*, genes that encode enzymes involved in detoxification
397 phase I and phase II, respectively (figure 6). The obtained results showed that
398 *Cyp4G* increased its activity after 24 h of exposure, but only with 20 µg/L of Vz.
399 On the other hand, the same exposure time produced an upregulation of the
400 *GstD3* gene when 200 µg/L of Vz was used. Neither of these two genes showed
401 altered expression at 48 h. These results suggest an early activation of the
402 detoxification mechanisms by Vz, but this activation is not maintained in the

403 time. They also suggest that phase I and phase II could be activated by the
404 presence of Vz. The upregulation of *Cyp4G* might be in response to Vz because
405 this gene also reacts to the presence of other toxicants (Martínez-Paz et al.,
406 2012). On the other hand, *GstD3* is a gene that encodes for an enzyme
407 involved in phase II, and the increase in its mRNA levels at 200 µg/L of Vz
408 exposure suggests that the detoxification of Vz in the cell includes a GST
409 conjugation process. Studies in mice have showed that Vz injections induce the
410 Cyp enzymes and GST activity (Cantelli-Forti and Camerino, 1998) so the
411 results obtained in this work are in agreement with those observed in
412 vertebrates.

413 **4. CONCLUSIONS**

414 In summary, Vz causes diverse effects in the transcription of several genes
415 related to the endocrine system and stress response in *C. riparius*. The most
416 affected hormonal pathway of the two studied is the ecdysone-activated
417 cascade, but the insulin-like peptide response pathway could be also altered.
418 These results reveal new possibilities in the mode of action of this substance.
419 Furthermore, our results suggest that ecdysone inactivation is also affected in
420 *C. riparius*. On the other hand, the stress response seemed to be activated, as
421 several HSP genes were upregulated. However, this activation could also be
422 related to the endocrine system because the genes analyzed could interact with
423 hormonal responses. Finally, the detoxification mechanisms were analyzed, and
424 results similar to previous data on vertebrates were obtained, suggesting that
425 the detoxification of Vz uses similar pathways. To our knowledge, this is the first
426 study that raises the possibility of a hormonal target different from steroids for

427 vinclozolin. Although this compound has been banned from EU and its use in
428 US is declining, it is widely used in other countries, like China, so it is necessary
429 to get a better picture of its mode of action and get new tools to evaluate how
430 affects the environment. Additionally, this study opens up new possibilities in
431 the analysis of the effects that Vz has in invertebrates and highlights that its
432 mode of action in invertebrates could involve different pathways to those
433 observed in vertebrates. Finally, the obtained data offer new perspectives in the
434 analysis of a model anti-androgen compound that could help to develop better
435 approaches to the study of this kind of endocrine disruptors in invertebrates.

436 **ACKNOWLEDGEMENTS**

437 This work was supported by the *Plan Nacional de Investigación Científica,*
438 *Desarrollo e Innovación Tecnológica* (Spain), grant CTM2012-37547 from the
439 *Ciencias y Tecnologías Medioambientales* program. The authors declare that
440 there are no conflicts of interest. M.A. is the receiver of a predoctoral contract
441 from the Ministry of Economy and Finance (BES-2013-064041).

442

443 **Bibliography**

- 444 Arbeitman, M.N., and Hogness, D.S. (2000). Molecular Chaperones Activate the *Drosophila*
445 Ecdysone Receptor, an RXR Heterodimer. *Cell* *101*, 67–77.
- 446 Bakthisaran, R., Tangirala, R., and Rao, C.M. (2015). Small heat shock proteins: Role in cellular
447 functions and pathology. *Biochim. Biophys. Acta* *1854*, 291–319.
- 448 Cantelli-Forti, G., and Camerino, A. (1998). Testosterone hydroxylase as multibiomarker of
449 effect in evaluating vinclozolin cocarcinogenesis. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response*
450 *Susceptibility Chem.* *3*, 191–203.
- 451 Carnevali, O., and Maradonna, F. (2003). Exposure to xenobiotic compounds: looking for new
452 biomarkers. *Gen. Comp. Endocrinol.* *131*, 203–208.
- 453 Casati, L., Sendra, R., Sibilina, V., and Celotti, F. (2015). Endocrine disruptors: the new players
454 able to affect the epigenome. *Front. Cell Dev. Biol.* *3*, 37.
- 455 Chen, B., Zhong, D., and Monteiro, A. (2006). Comparative genomics and evolution of the
456 HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics* *7*, 156.
- 457 Chen, H., Zha, J., Liang, X., Li, J., and Wang, Z. (2014). Effects of the human antiepileptic drug
458 carbamazepine on the behavior, biomarkers, and heat shock proteins in the Asian clam
459 *Corbicula fluminea*. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* *155*, 1–8.
- 460 Didelot, C., Schmitt, E., Brunet, M., Maingret, L., Parcellier, A., and Garrido, C. (2006). Heat
461 shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb. Exp. Pharmacol.* 171–
462 198.
- 463 Ducrot, V., Teixeira-Alves, M., Lopes, C., Delignette-Muller, M.-L., Charles, S., and Lagadic, L.
464 (2010). Development of partial life-cycle experiments to assess the effects of endocrine
465 disruptors on the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*: a case-study with vinclozolin.
466 *Ecotoxicol.* *19*, 1312–1321.
- 467 El-Shahat, M.F., Al-Nawayseh, K.M., Jiries, A.G., and Alnasir, F.M. (2003). Pesticides and heavy
468 metal distribution in southern Dead Sea basin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *71*, 1230–1238.
- 469 Garofalo, R.S. (2002). Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *Trends Endocrinol.*
470 *Metab.* *13*, 156–162.
- 471 Gehring, U. (1998). Steroid hormone receptors and heat shock proteins. *Vitam. Horm.* *54*, 167–
472 205.
- 473 Gilbert, L.I. (2004). Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone
474 biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Endocrinol.* *215*, 1–10.
- 475 Goberdhan, D.C.I., and Wilson, C. (2003). The functions of insulin signaling: size isn't
476 everything, even in *Drosophila*. *Differ. Res. Biol. Divers.* *71*, 375–397.
- 477 Guittard, E., Blais, C., Maria, A., Parvy, J.-P., Pasricha, S., Lumb, C., Lafont, R., Daborn, P.J., and
478 Dauphin-Villemant, C. (2011). CYP18A1, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone
479 inactivation, is essential for metamorphosis. *Dev. Biol.* *349*, 35–45.

- 480 Haeba, M.H., Hilscherová, K., Mazurová, E., and Bláha, L. (2008). Selected endocrine disrupting
481 compounds (vinclozolin, flutamide, ketoconazole and dicofol): effects on survival, occurrence
482 of males, growth, molting and reproduction of *Daphnia magna*. Environ. Sci. Pollut. Res. Int.
483 15, 222–227.
- 484 Herrero, Ó., Planelló, R., and Morcillo, G. (2015). The plasticizer benzyl butyl phthalate (BBP)
485 alters the ecdysone hormone pathway, the cellular response to stress, the energy metabolism,
486 and several detoxication mechanisms in *Chironomus riparius* larvae. Chemosphere 128, 266–
487 277.
- 488 Iga, M., and Kataoka, H. (2012). Recent studies on insect hormone metabolic pathways
489 mediated by cytochrome P450 enzymes. Biol. Pharm. Bull. 35, 838–843.
- 490 Iyanagi, T. (2007). Molecular Mechanism of Phase I and Phase II Drug-Metabolizing Enzymes:
491 Implications for Detoxification. B.-I.R. of Cytology, ed. (Academic Press), pp. 35–112.
- 492 Kavlock, R., and Cummings, A. (2005). Mode of action: inhibition of androgen receptor
493 function--vinclozolin-induced malformations in reproductive development. Crit. Rev. Toxicol.
494 35, 721–726.
- 495 Kimura, I., Nakayama, Y., Konishi, M., Terasawa, K., Ohta, M., Itoh, N., and Fujimoto, M. (2012).
496 Functions of MAPR (membrane-associated progesterone receptor) family members as
497 heme/steroid-binding proteins. Curr. Protein Pept. Sci. 13, 687–696.
- 498 Lagadic, L., Coutellec, M.-A., and Caquet, T. (2007). Endocrine disruption in aquatic pulmonate
499 molluscs: few evidences, many challenges. Ecotoxicol. 16, 45–59.
- 500 Lee, S.-B., and Choi, J. (2007). Effects of bisphenol A and ethynyl estradiol exposure on enzyme
501 activities, growth and development in the fourth instar larvae of *Chironomus riparius* (Diptera,
502 Chironomidae). Ecotoxicol. Environ. Saf. 68, 84–90.
- 503 LeEVERS, S.J. (2001). Growth control: invertebrate insulin surprises! Curr. Biol. 11, R209–R212.
- 504 Lemos, M.F.L., Gestel, C.A.M. van, and Soares, A.M.V.M. (2009). Endocrine disruption in a
505 terrestrial isopod under exposure to bisphenol A and vinclozolin. J. Soils Sediments 9, 492–500.
- 506 Lemos, M.F.L., Esteves, A.C., Samyn, B., Timperman, I., van Beeumen, J., Correia, A., van
507 Gestel, C.A.M., and Soares, A.M.V.M. (2010a). Protein differential expression induced by
508 endocrine disrupting compounds in a terrestrial isopod. Chemosphere 79, 570–576.
- 509 Lemos, M.F.L., van Gestel, C.A.M., and Soares, A.M.V.M. (2010b). Developmental toxicity of
510 endocrine disrupters bisphenol A and vinclozolin in a terrestrial isopod. Arch. Environ. Contam.
511 Toxicol. 59, 274–281.
- 512 Lemos, M.F.L., van Gestel, C. a. M., and Soares, A.M.V.M. (2010c). Reproductive toxicity of the
513 endocrine disrupters vinclozolin and bisphenol A in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*
514 (Latreille, 1804). Chemosphere 78, 907–913.
- 515 Lin, D., Li, Y., Zhou, Q., Xu, Y., and Wang, D. (2014). Effect of triclosan on reproduction, DNA
516 damage and heat shock protein gene expression of the earthworm *Eisenia fetida*. Ecotoxicol.
517 23, 1826–1832.

- 518 Liu, T., Li, Y., Zhao, X., Zhang, M., and Gu, W. (2014). Ethylparaben affects lifespan, fecundity,
519 and the expression levels of ERR, EcR and YPR in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* *71*,
520 1–7.
- 521 Marinković, M., de Leeuw, W.C., de Jong, M., Kraak, M.H.S., Admiraal, W., Breit, T.M., and
522 Jonker, M.J. (2012). Combining next-generation sequencing and microarray technology into a
523 transcriptomics approach for the non-model organism *Chironomus riparius*. *PLoS One* *7*,
524 e48096.
- 525 Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J.L., and Morcillo, G. (2012). Characterization
526 of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposures to xenobiotics
527 (tributyltin, nonylphenol, bisphenol A) in *Chironomus riparius* aquatic larvae. *Comp. Biochem.*
528 *Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP* *155*, 333–343.
- 529 Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J.L., and Morcillo, G. (2013). Genotoxic
530 effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius*
531 evaluated using the comet assay. *Mutat. Res.* *758*, 41–47.
- 532 Martín-Folgar, R., de la Fuente, M., Morcillo, G., and Martínez-Guitarte, J.-L. (2015).
533 Characterization of six small HSP genes from *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae):
534 Differential expression under conditions of normal growth and heat-induced stress. *Comp.*
535 *Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* *188*, 76–86.
- 536 Marzec, M., Eletto, D., and Argon, Y. (2012). GRP94: An HSP90-like protein specialized for
537 protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* *1823*,
538 774–787.
- 539 Maynard, J.C., Pham, T., Zheng, T., Jockheck-Clark, A., Rankin, H.B., Newgard, C.B., Spana, E.P.,
540 and Nicchitta, C.V. (2010). Gp93, the *Drosophila* GRP94 ortholog, is required for gut epithelial
541 homeostasis and nutrient assimilation-coupled growth control. *Dev. Biol.* *339*, 295–306.
- 542 Morales, M., Martínez-Paz, P., Ozáez, I., Martínez-Guitarte, J.L., and Morcillo, G. (2013). DNA
543 damage and transcriptional changes induced by tributyltin (TBT) after short in vivo exposures
544 of *Chironomus riparius* (Diptera) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* *158*, 57–
545 63.
- 546 Morales, M., Martínez-Paz, P., Martín, R., Planelló, R., Urien, J., Martínez-Guitarte, J.L., and
547 Morcillo, G. (2014). Transcriptional changes induced by in vivo exposure to pentachlorophenol
548 (PCP) in *Chironomus riparius* (Diptera) aquatic larvae. *Aquat. Toxicol.* *157*, 1–9.
- 549 Morimoto, R.I., Kline, M.P., Bimston, D.N., and Cotto, J.J. (1997). The heat-shock response:
550 regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem.* *32*,
551 17–29.
- 552 Morrow, G., Hightower, L.E., and Tanguay, R.M. (2015). Small heat shock proteins: big folding
553 machines. *Cell Stress Chaperones* *20*, 207–212.
- 554 Nair, P.M.G., and Choi, J. (2011). Identification, characterization and expression profiles of
555 *Chironomus riparius* glutathione S-transferase (GST) genes in response to cadmium and silver
556 nanoparticles exposure. *Aquat. Toxicol.* *101*, 550–560.

- 557 Nair, P.M.G., Park, S.Y., and Choi, J. (2011). Expression of catalase and glutathione S-
558 transferase genes in *Chironomus riparius* on exposure to cadmium and nonylphenol. Comp.
559 Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. *154*, 399-408
- 560 Nation, James L. (2008). Insect Physiology and Biochemistry (Boca Raton, Florida, USA: CRC
561 Press, Taylor&Francis Group).
- 562 Neufeld, T.P. (2003). Shrinkage control: regulation of insulin-mediated growth by FOXO
563 transcription factors. J. Biol. *2*, 18.
- 564 de Oca, F.G.G.-M., López-González, M. de L., Escobar-Wilches, D.C., Chavira-Ramírez, R., and
565 Sierra-Santoyo, A. (2015). Vinclozolin modulates hepatic cytochrome P450 isoforms during
566 pregnancy. Reprod. Toxicol. *53*, 119–126.
- 567 OECD (2004a). Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment
568 (Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development).
- 569 OECD (2004b). Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water (Paris:
570 Organisation for Economic Co-operation and Development).
- 571 OECD (2010). Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked
572 Water or Spiked Sediment (Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development).
- 573 OECD (2011). Test No. 235: *Chironomus sp.*, Acute Immobilisation Test (Paris: Organisation for
574 Economic Co-operation and Development).
- 575 Oppold, A., Kreß, A., Vanden Bussche, J., Diogo, J.B., Kuch, U., Oehlmann, J., Vandegheuchte,
576 M.B., and Müller, R. (2015). Epigenetic alterations and decreasing insecticide sensitivity of the
577 Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. *122*, 45–53.
- 578 Ozáez, I., Martínez-Guitarte, J.L., and Morcillo, G. (2013). Effects of in vivo exposure to UV
579 filters (4-MBC, OMC, BP-3, 4-HB, OC, OD-PABA) on endocrine signaling genes in the insect
580 *Chironomus riparius*. Sci. Total Environ. *456-457*, 120–126.
- 581 Ozáez, I., Martínez-Guitarte, J.L., and Morcillo, G. (2014). The UV filter benzophenone 3 (BP-3)
582 activates hormonal genes mimicking the action of ecdysone and alters embryo development
583 in the insect *Chironomus riparius* (Diptera). Environ. Pollut. *192C*, 19–26.
- 584 Paoloni-Giacobino, A. (2014). Epigenetic effects of methoxychlor and vinclozolin on male
585 gametes. Vitam. Horm. *94*, 211–227.
- 586 Planelló, R., Martínez-Guitarte, J.L., and Morcillo, G. (2007). Ribosomal genes as early targets
587 of cadmium-induced toxicity in *Chironomus riparius* larvae. Sci. Total Environ. *373*, 113–121.
- 588 Planelló, R., Martínez-Guitarte, J.L., and Morcillo, G. (2008). The endocrine disruptor bisphenol
589 A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of
590 *Chironomus riparius*. Chemosphere *71*, 1870–1876.
- 591 Planelló, R., Herrero, O., Martínez-Guitarte, J.L., and Morcillo, G. (2011). Comparative effects of
592 butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of
593 *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the
594 stress response and ribosomes. Aquat. Toxicol. *105*, 62–70.

- 595 van Ravenzwaay, B., Kolle, S.N., Ramirez, T., and Kamp, H.G. (2013). Vinclozolin: A case study
596 on the identification of endocrine active substances in the past and a future perspective.
597 *Toxicol. Lett.* **223**, 271–279.
- 598 Rewitz, K.F., Rybczynski, R., Warren, J.T., and Gilbert, L.I. (2006). The Halloween genes code for
599 cytochrome P450 enzymes mediating synthesis of the insect moulting hormone. *Biochem. Soc.*
600 *Trans.* **34**, 1256–1260.
- 601 Rieradevall M, Garcia-Berthou E, and Prat N (1995). Chironomids in the diet of fish in Lake
602 Banyoles (Catalonia, Spain). In *Chironomids from Genes to Ecosystems*, (Australia: CSIRO), pp.
603 335–342.
- 604 Ronis, M.J., Celander, M., and Badger, T.M. (1998). Cytochrome P450 enzymes in the kidney of
605 the bobwhite quail (*Colinus virginianus*): induction and inhibition by ergosterol biosynthesis
606 inhibiting fungicides. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **121**, 221–229.
- 607 Sánchez-Argüello, P., Aparicio, N., and Fernández, C. (2012). Linking embryo toxicity with
608 genotoxic responses in the freshwater snail *Physa acuta*: single exposure to benzo(a)pyrene,
609 fluoxetine, bisphenol A, vinclozolin and exposure to binary mixtures with benzo(a)pyrene.
610 *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **80**, 152–160.
- 611 Scott, A.P. (2012). Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? Part I:
612 Critical appraisal of the evidence for the presence, biosynthesis and uptake of steroids.
613 *Steroids* **77**, 1450–1468.
- 614 Scott, A.P. (2013). Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? II.
615 Critical review of the evidence that steroids have biological effects. *Steroids* **78**, 268–281.
- 616 Skinner, M.K., and Anway, M.D. (2007). Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on
617 the development of disease and cancer. *Crit. Rev. Oncog.* **13**, 75–82.
- 618 Tillmann, M., Schulte-Oehlmann, U., Duft, M., Markert, B., and Oehlmann, J. (2001). Effects of
619 endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III:
620 Cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicol.* **10**, 373–388.
- 621 Vandegehuchte, M.B., Lemièrre, F., Vanhaecke, L., Vanden Berghe, W., and Janssen, C.R. (2010).
622 Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on
623 DNA methylation. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* **151**, 278–285.
- 624 Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Jr, Lee, D.-H., Shioda, T.,
625 Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., et al. (2012). Hormones and endocrine-disrupting
626 chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr. Rev.* **33**, 378–455.
- 627 Wanderling, S., Simen, B.B., Ostrovsky, O., Ahmed, N.T., Vogen, S.M., Gidalevitz, T., and Argon,
628 Y. (2007). GRP94 is essential for mesoderm induction and muscle development because it
629 regulates insulin-like growth factor secretion. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3764–3775.
- 630 Welshons, W.V., Thayer, K.A., Judy, B.M., Taylor, J.A., Curran, E.M., and vom Saal, F.S. (2003).
631 Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with
632 estrogenic activity. *Environ. Health Perspect.* **111**, 994–1006.

- 633 Wilson, V.S., Blystone, C.R., Hotchkiss, A.K., Rider, C.V., and Gray, L.E. (2008). Diverse
634 mechanisms of anti-androgen action: impact on male rat reproductive tract development. *Int.*
635 *J. Androl.* *31*, 178–187.
- 636 Wu, Q., and Brown, M.R. (2006). Signaling and function of insulin-like peptides in insects.
637 *Annu. Rev. Entomol.* *51*, 1–24.
- 638 Wu, Y.H., Wu, T.M., Hong, C.Y., Wang, Y.S., and Yen, J.H. (2014). Screening differentially
639 expressed genes in an amphipod (*Hyaella azteca*) exposed to fungicide vinclozolin by
640 suppression subtractive hybridization. *J. Environ. Sci. Health B* *49*, 856–863.
- 641 Yang, Y., and Li, Z. (2005). Roles of heat shock protein gp96 in the ER quality control: redundant
642 or unique function? *Mol. Cells* *20*, 173–182.
- 643 Zhang, L.-H., and Zhang, X. (2010). Roles of GRP78 in physiology and cancer. *J. Cell. Biochem.*
644 *110*, 1299–1305.
- 645
- 646

647 **Table 1. Characteristics and accession numbers of the sequences used.**

Accession	Size - ORF	Gene	ORF	Symbol	Function	Homolog protein <i>D. melanogaster</i>	Identity/ homology
KA185210.1	1518 bp - 471 aa	Cytochrome P450 18a1	Incomplete	<i>Cyp18A1</i>	Inactivation of ecdysone	NP_728191.1	64%/77%
KA194426.1 KA190753.1	526 bp - 156 aa 747 bp - 169 aa	Disembodied	Incomplete	<i>Dib</i>	Synthesis of ecdysone	NP_524810.2	54%/72%
KA177910.1	2644 bp - 605 aa	Transcription factor E74	Incomplete	<i>E74</i>	Ecdysone response pathway	NP_730288.1	78-43%
KA184959.1	1985 bp - 497 aa	Forkhead box sub-group O	Incomplete	<i>FOXO</i>	Insulin receptor response pathway	NP_650330.3	55%/63%
KA183318.1	2513 bp - 794 aa	Glycoprotein 93	Complete	<i>Gp93</i>	Endoplasmic reticulum paralog of Hsp90	NP_651601.1	73%/87%
KA180012.1	2225 bp - 622 aa	Krüppel homolog 1	Incomplete	<i>Kr-h1</i>	Ecdysone and juvenile hormone response pathways	NP_477466.1	74%/81%
KA185639.1	1413 bp - 203 aa	Membrane associated progesterone receptor	Incomplete	<i>Mapr</i>	Orphan receptor in invertebrates	NP_573087.1	59%/77%

648

649 **Table 2. Primers used in Real-time PCR.**

Name	Sequence	Efficiency
Cyp18a1 F	GTTTCACTCGAGACGATCCA	104.5
Cyp18a1 R	TTTAGCGGCTTGAAATGTTG	
Cyp4G F	TAAGTGGAAGTGGTGGGTACAT	99.5
Cyp4G R	TTGCATTGTGCATTTTAGGATGTC	
Dib F	GAGGCATCCATACAACCTTCATTC	98.4
Dib R	CAAAATCCTTCCAACCTCCAATAG	
E74 F	TCTTACTGAAACTTCTTCAAG	105.4
E74 R	GCTTTGAGACAGCTTTGGAAT	
EcR F	TCTTCTCACGGCCATCGTCA	107.1
EcR R	GCTGCATCTTGTTCGCCAC	
FOXO F	ATGGCGGTGATGTCCAACAA	97.5
FOXO R	TGAACCCACGAATTGCACGA	
GAPDH F	GGTATTTCAATTGAATGATCACTTTG	107.7
GAPDH R	TAATCCTTGGATTGCATGTACTTG	
Gp93 F	ACCCCATGTGTA CTCTGTTGC	103.5
Gp93 R	CGTGGATTA AATTGAGAGC	
GST D3 F	TGGTTGAAACGAGAGCACCA	110.5
GST D3 R	TCGGATATAGAGTGCCAGCATCG	
Hsp24 F	TCACTTAATGACTGGATATCG	100.0
Hsp24 R	GAATCCATCCTTGCCGAAATGC	
Hsp70 F	ACTTGAACCAAGTTGAGCGT	102.8
Hsp70 R	TTGCCACAGAAGAAATCTTG	
Kr-h1 F	CCCTCGAGCTAACTCCACCC	103.9
Kr-h1 R	GCTGCAATGTTTGACTGGTT	
rpL13 F	AAGCTGCTTTCCCAAGAC	108,7
rpL13 R	TTGGCATAATTGGTCCAG	
MAPR F	GGACCGTATGCAGCTTTTGG	101.6
MAPR R	TTGTCGCCAGGCCTTAACA	

650

651 **Figure 1.** The dose- and time-dependent effects of Vz exposure on the survival
652 of fourth instar *Chironomus riparius* larvae. The values represent the mean and
653 standard error (SE) from three independent experiments (n=150).

654 **Figure 2.** The transcription levels of the *Ecdysone Receptor*, *E74*, and *Krüppel*
655 *homolog 1* genes. Larvae were treated with 20 µg/L (69.9 nM) and 200 µg/L
656 (699 nM) of Vz for 24 and 48 hours. RT-PCR experiments were carried out
657 using the primers listed in Table 2. The transcript levels were normalized using
658 the mRNA levels of the *GAPDH* and *rpL13* genes. Whisker boxes are shown.
659 The number of larvae for each box is seven (n=7). The horizontal line within the
660 box indicates the median. The boundaries of the box indicate the 25th- and 75th-
661 percentiles, and the whiskers indicate the highest and lowest results. The mean
662 is indicated by the small circle inside the box. The treated larvae were
663 compared to the control larvae. *Significant difference ($p \leq 0.05$).

664 **Figure 3.** The expression of genes involved in ecdysone metabolism. The
665 mRNA levels of the *Disembodied* and *Cyp18A1* genes were analyzed in larvae
666 treated with 20 µg/L (69.9 nM) and 200 µg/L (699 nM) of Vz for 24 and 48
667 hours. The primers used in the RT-PCR experiments are listed in Table 2. The
668 transcript levels were normalized using the mRNA levels of the *GAPDH* and
669 *rpL13* genes. Whisker boxes are shown. The number of larvae for each box is
670 seven (n=7). The horizontal line within the box indicates the median. The
671 boundaries of the box indicate the 25th- and 75th-percentiles, and the whiskers
672 indicate the highest and lowest results. The mean is indicated by the small
673 circle inside the box. The treated larvae were compared to the control larvae.
674 *Significant difference ($p \leq 0.05$).

675 **Figure 4.** The transcription levels of the *FOXO* and *MAPR* genes. These genes
676 were studied during exposure to 20 µg/L (69.9 nM) and 200 µg/L (699 nM) of Vz
677 for 24 and 48 hours. RT-PCR experiments were carried out with the primers
678 listed in Table 2. The transcript levels were normalized using the mRNA levels
679 of the *GAPDH* and *rpL13* genes. Whisker boxes are shown. The number of
680 larvae for each box is seven (n=7). The horizontal line within the box indicates
681 the median. The boundaries of the box indicate the 25th- and 75th-percentiles,
682 and the whiskers indicate the highest and lowest results. The mean is indicated
683 by the small circle inside the box. The treated larvae were compared to the
684 control larvae. *Significant difference ($p \leq 0.05$).

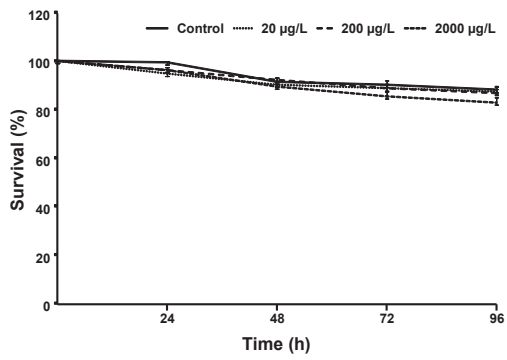
685 **Figure 5.** The expression levels of the *hsp70*, *hsp24*, and *Gp93* genes. Larvae
686 were treated with 20 µg/L (69.9 nM) and 200 µg/L (699 nM) of Vz for 24 and 48
687 hours. The RT-PCR experiments were carried out with the primers listed in
688 Table 2. The transcript levels were normalized using the mRNA levels of the
689 *GAPDH* and *rpL13* genes. Whisker boxes are shown. The number of larvae for
690 each box is seven (n=7). The horizontal line within the box indicates the
691 median. The boundaries of the box indicate the 25th- and 75th-percentiles, and
692 the whiskers indicate the highest and lowest results. The mean is indicated by
693 the small circle inside the box. The treated larvae were compared to the control
694 larvae. *Significant difference ($p \leq 0.05$).

695 **Figure 6.** The mRNA levels of the genes encoding for enzymes involved in
696 detoxification mechanisms. The mRNA levels of the *Cyp4G* and *GstD3* genes
697 were analyzed in larvae exposed to 20 µg/L (69.9 nM) and 200 µg/L (699 nM) of
698 Vz for 24 and 48 hours. RT-PCR experiments were carried out with the primers
699 listed in Table 2. The transcript levels were normalized using the mRNA levels

700 of the *GAPDH* and *rpL13* genes. Whisker boxes are shown. The number of
701 larvae for each box is seven ($n=7$). The horizontal line within the box indicates
702 the median. The boundaries of the box indicate the 25th- and 75th-percentiles,
703 and the whiskers indicate the highest and lowest results. The mean is indicated
704 by the small circle inside the box. The treated larvae were compared to the
705 control larvae. *Significant difference ($p \leq 0.05$).

706

Figure 1

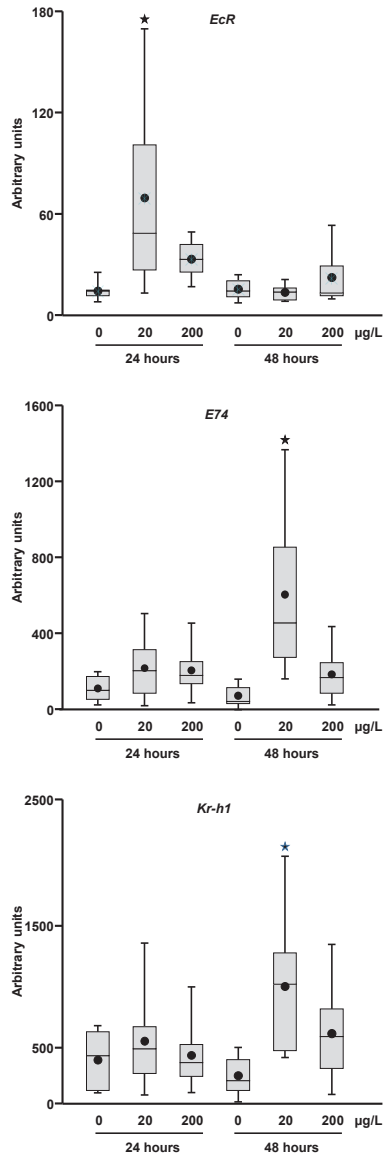


707

708

709

Figure 2

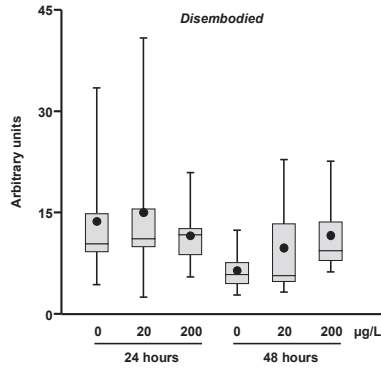


710

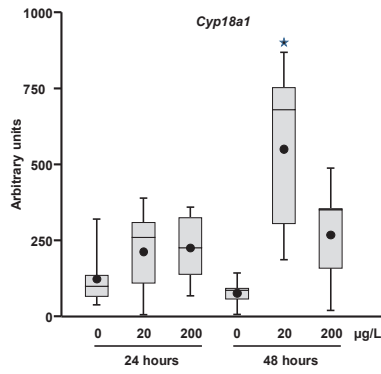
711

712

Figure 3



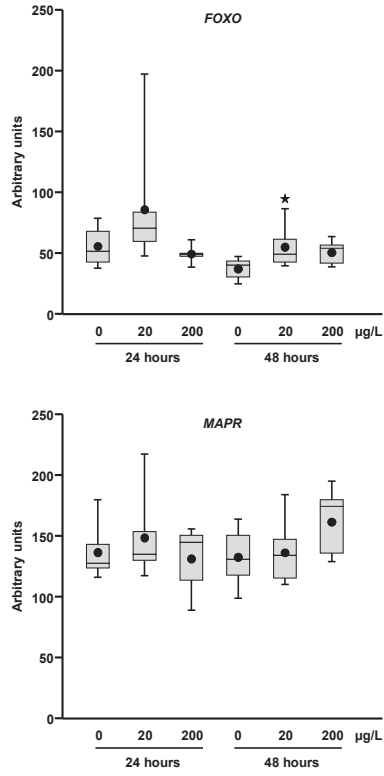
713



714

715

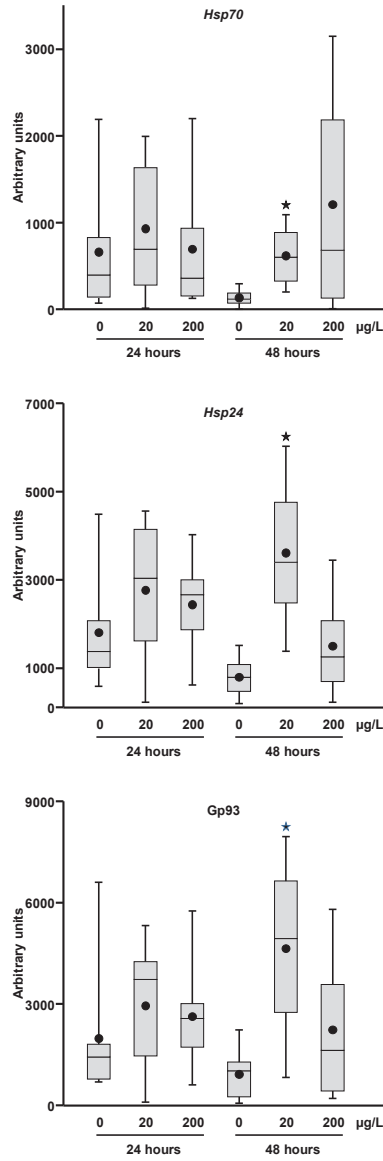
Figure 4



716

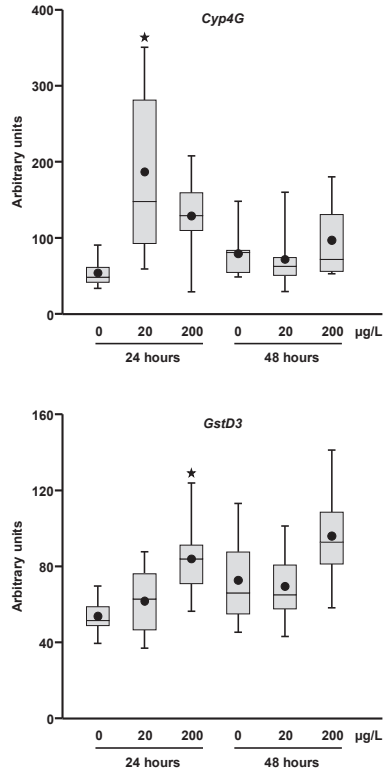
717

Figure 5



721

Figure 6



722



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

Genotoxic effects of vinclozolin on the aquatic insect *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae)[☆]

Mónica Aquilino^{a, *}, Paloma Sánchez-Argüello^b, José-Luis Martínez-Guitarte^a^a Grupo de Biología y Toxicología Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain^b Laboratorio de Ecotoxicología, Departamento de Medio Ambiente, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ctra. La Coruña km 7, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2017

Received in revised form

26 September 2017

Accepted 26 September 2017

Available online 5 October 2017

Keywords:

Vinclozolin

Genotoxicity

Comet assay

DNA repair genes

Chironomus riparius

ABSTRACT

Vinclozolin (Vz) is a pollutant found in aquatic environments whose antiandrogenic effects in reproduction are well known in mammals. Although its reproductive effects have been less studied in invertebrates, other effects, including genotoxicity, have been described. Therefore, in this work, we studied the genotoxic effects of Vz in the freshwater benthic invertebrate *Chironomus riparius*. DNA damage was evaluated with the comet assay (tail area, olive moment, tail moment and % DNA in tail), and the transcriptional levels of different genes involved in DNA repair (*ATM*, *NLK* and *XRCC1*) and apoptosis (*DECAY*) were measured by RT-PCR. Fourth instar larvae of *C. riparius*, were exposed to Vz for 24 h at 20 and 200 µg/L. The Vz exposures affected the DNA integrity in this organism, since a dose-response relationship occurred, with DNA strand breaks significantly increased with increased dose for tail area, olive moment and tail moment parameters. Additionally, the lower concentration of Vz produced a significant induction of the transcripts of three genes under study (*ATM*, *NLK* and *XRCC1*) showing the activation of the cellular repair mechanism. In contrast, the expression of these genes with the highest concentration were downregulated, indicating failure of the cellular repair mechanism, which would explain the higher DNA damage. These data report for the first time the alterations of Vz on gene transcription of an insect and confirm the potential genotoxicity of this compound on freshwater invertebrates.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In the last two decades, we have seen growing scientific concern and public debate over the possible deleterious effects in humans and wildlife that can result from exposure to substances that interfere with the endocrine system. These substances are termed endocrine disruptor chemicals (EDCs). Recently, chemicals that alter androgen signaling have gained more attention, particularly antiandrogenic compounds such as vinclozolin (Vz). Vinclozolin is a dicarboximide fungicide widely used for the control of diseases in fruits, vegetables, and ornamental plants (Anway et al., 2006), and it has been described by the European Chemicals Agency ECHA as a substance that may damage fertility and disturb embryonic

development, is toxic to aquatic life with long-lasting effects, and is suspected of causing cancer and allergic skin reactions. Vinclozolin possesses antiandrogenic activity in mammals and fish (Kavlock and Cummings, 2005; Kiparissis et al., 2003), and has been detected in surface waters at concentrations of 0.1–2.4 µg/L (El-Shahat et al., 2003).

The toxic potential of Vz has been studied in numerous species, mostly vertebrates, and has been shown to adversely affect a wide range of cellular components and processes (Flick et al., 2017; Hoffmann and Kloas, 2016; Jedeon et al., 2016). However, its molecular mechanisms of action have still not been fully characterized despite a variety of studies on its endocrine toxic effects. EDCs are reactive chemicals that exhibit different mechanisms of toxicity, and damage to genetic material may contribute toward the overall toxic impact of a particular chemical. However, although they have a diverse chemical nature, there is still little information about the capability of endocrine active compounds to interact with DNA, particularly in freshwater invertebrates that are poorly represented

[☆] This paper has been recommended for acceptance by Klaus Kummerer.

* Corresponding author.

E-mail address: maquilino@ccia.uned.es (M. Aquilino).

1 **Genotoxic effects of vinclozolin on the aquatic insect *Chironomus riparius***

2 Mónica Aquilino^{1*}, Paloma Sánchez-Argüello², José-Luis Martínez-Guitarte¹.

3 ¹Grupo de Biología y Toxicología Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad

4 Nacional de Educación a Distancia (UNED), Senda del Rey 9, 28040 Madrid,

5 Spain.

6 ²Laboratorio de Ecotoxicología, Departamento de Medio Ambiente, Instituto

7 Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ctra. La

8 Coruña km 7, 28040 Madrid, Spain.

9 *Corresponding author: Mónica Aquilino, Facultad de Ciencias, UNED, Senda
10 del Rey 9, 28040 Madrid, Spain. Telephone: +34913987137.

11 E-mail: maquilino@ccia.uned.es

12

13 **Abstract**

14 Vinclozolin (Vz) is a pollutant found in aquatic environments whose
15 antiandrogenic effects in reproduction are well known in mammals. Although its
16 reproductive effects have been less studied in invertebrates, other effects,
17 including genotoxicity, have been described. Therefore, in this work, we studied
18 the genotoxic effects of Vz in the freshwater benthic invertebrate *Chironomus*
19 *riparius*. DNA damage was evaluated with the comet assay, and the
20 transcriptional levels of different genes involved in DNA repair (*ATM*, *NLK* and
21 *XRCC1*) and apoptosis (*DECAY*) were measured by RT-PCR. Fourth instar
22 larvae of *C. riparius*, were exposed to Vz for 24 hours at 20 and 200 µg/L. The
23 Vz exposures affected the DNA integrity in this organism, since a dose-
24 response relationship occurred, with DNA strand breaks significantly increased
25 with increased dose (tail area, olive moment, tail moment and % DNA in tail).
26 Additionally, the lower concentration of Vz produced a significant induction of
27 the transcripts of three genes under study (*ATM*, *NLK* and *XRCC1*) showing the
28 activation of the cellular repair mechanism. In contrast, the expression of these
29 genes with the highest concentration were downregulated, indicating failure of
30 the cellular repair mechanism, which would explain the higher DNA damage.
31 These data report for the first time the alterations of Vz on gene transcription of
32 an insect and confirm the potential genotoxicity of this compound on freshwater
33 invertebrates.

34 **Keywords:** Vinclozolin, Genotoxicity, *Chironomus riparius*.

35 **Capsule:** Our results demonstrate that Vz produce a significant induction of
36 genes involved in DNA repair and an increase in DNA strand breaks.

41 1. INTRODUCTION

42 Vinclozolin (Vz; [3-(3,5-dichlorophenyl)-5-methyl-5-vinyloxazolidine 2,4-dione])
43 is a widely used fungicide that has been classified by the European Chemical
44 Agency as toxic to aquatic life with long lasting effects, and its use was formally
45 unauthorized in Europe in 2007 but it is still used in other countries. It was found
46 in groundwater at concentrations ranging from 60 to 220 ppb and in surface
47 water from 128 to 390 ppb (El-Shahat et al., 2003). It is classified as a possible
48 human carcinogen (Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential, Office of
49 Pesticide Programs, U.S. Environmental Protection Agency), as unlikely to
50 present acute hazard in normal use (The WHO recommended classification of
51 pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004, WHO), and has
52 been described as an antiandrogen in vertebrates with additional
53 transgenerational effects because it alters the epigenome (Casati et al., 2015;
54 Paoloni-Giacobino, 2014; van Ravenzwaay et al., 2013; Skinner and Anway,
55 2007). Although it has been intensively studied in vertebrates, information
56 concerning its effects on invertebrates is still scarce. It is known that Vz does
57 not affect the survival nor the reproduction of *Daphnia magna* at environmental
58 concentrations, but this compound shows some effects related to its
59 development (Haeba et al., 2008; Vandegehuchte et al., 2010). It also affects
60 the development and reproduction of isopods (Lemos et al., 2009, 2010a,
61 2010b, 2010c). Previous research has indicated that this fungicide may alter the
62 reproduction of mollusks. Tillmann et al. (2001) described the earlier sexual
63 response and the stimulation of egg mass production in *Marisa cornuarietis* due
64 to Vz (Lagadic et al., 2007). Furthermore, lower fecundity, which can be
65 attributed to Vz, has been observed in the pond snail *Lymnaea stagnalis*

15 **ABSTRACT**

16 Vinclozolin is a fungicide used in agriculture that can reach aquatic ecosystems and
17 affect the organisms living there. Its effects have been intensively studied in
18 vertebrates, where it acts as an antiandrogen, but there is a lack of information about
19 its mechanistic effects on invertebrates. In this work, we analyzed the response of
20 genes related to the endocrine system, the stress response, and the detoxification
21 mechanisms of *Chironomus riparius* fourth instar larvae after 24h and 48h exposures to
22 20 (69.9 nM), 200 (699 nM), and 2000 µg/L (6.99 µM) of Vinclozolin. Survival analysis
23 showed that this compound has low toxicity, as it was not lethal for this organism at the
24 concentrations used. However, this fungicide was shown to modify the transcriptional
25 activity of the ecdysone response pathway genes *EcR*, *E74*, and *Kr-h1* by increasing
26 their mRNA levels. While no changes were observed in *disembodied*, a gene related
27 with the ecdysone synthesis metabolic pathway, *Cyp18A1*, which is involved in the
28 inactivation of the active form of ecdysone, was upregulated. Additionally, the
29 expression of two genes related to other hormones, *FOXO* and *MAPR*, did not show
30 any changes when Vinclozolin was present. The analysis of stress response genes
31 showed significant changes in the mRNA levels of *Hsp70*, *Hsp24*, and *Gp93*, indicating
32 that Vinclozolin activates the cellular stress mechanisms. Finally, the expressions of
33 the genes *Cyp4G* and *GstD3*, which encode enzymes involved in phase I and phase II
34 detoxification, respectively, were analyzed. It was found that their mRNA levels were
35 altered by Vinclozolin, suggesting their involvement in the degradation of this
36 compound. For the first time, these results show evidence that Vinclozolin can
37 modulate gene expression, leading to possible significant endocrine alterations of the
38 insect endocrine system. These results also offer new clues about the mode of action
39 of this compound in invertebrates.

40

38 Introduction

39 In the last two decades, we have seen growing scientific concern and public
40 debate over the possible deleterious effects in humans and wildlife that can
41 result from exposure to substances that interfere with the endocrine system.
42 These substances are termed endocrine disruptor chemicals (EDCs). Recently,
43 chemicals that alter androgen signaling have gained more attention, particularly
44 antiandrogenic compounds such as Vinclozolin (Vz). Vz is a dicarboximide
45 fungicide widely used for the control of diseases in fruits, vegetables, and
46 ornamental plants (Anway et al., 2006), and it has been described by the
47 European Chemicals Agency ECHA as a substance that may damage fertility
48 and disturb the development of embryo, is toxic to aquatic life with long-lasting
49 effects, and is suspected of causing cancer and allergic skin reactions. Vz
50 possesses antiandrogenic activity in mammals and fish (Kavlock and
51 Cummings, 2005; Kiparissis et al., 2003), and has been detected in surface
52 waters at concentrations of 0.1–2.4 µg/L (El-Shahat et al., 2003).

53 The toxic potential of Vz has been studied in numerous species, mostly
54 vertebrates, and has been shown to adversely affect a wide range of cellular
55 components and processes (Flick et al., 2017; Hoffmann and Kloas, 2016;
56 Jedeon et al., 2016). However, its molecular mechanisms of action have still not
57 been fully characterized despite a variety of studies on its endocrine toxic
58 effects. EDCs are reactive chemicals that exhibit different mechanisms of
59 toxicity, and damage to genetic material may contribute toward the overall toxic
60 impact of a particular chemical. However, although they have a diverse
61 chemical nature, there is still little information about the capability of endocrine
62 active compounds to interact with DNA, particularly in freshwater invertebrates

63 that are poorly represented in previous studies (Martínez-Paz et al., 2013).
64 Accordingly, Hagger et al. (2006) demonstrated a clear association between
65 DNA damage and imposex induced by an EDC in the mollusk *Nucella lapillus*.

66 Genotoxicity is considered to be one of the most important toxicity parameters
67 in chemical testing and environmental risk assessment. Breaks produced in
68 DNA due to exposure to different compounds can become non-repaired lesions,
69 and as such, have been employed as biomarkers of genotoxicity. Most studies
70 that analyze the genotoxic effects caused by Vz are in human cells (Wu et al.,
71 2005) and bovine lymphocyte cells (Lioi et al., 1998), and usually use the
72 micronucleus test (MN). Almost nothing is known about the genotoxicity of Vz in
73 invertebrates, only MN induction in embryos of the freshwater snail *Physa acuta*
74 at non-environmentally relevant concentrations has been reported (Sánchez-
75 Argüello et al., 2012). Genotoxic effects involve DNA damage, which can be
76 analyzed by cytological methods, such as the comet assay, and determining the
77 expression of genes related to DNA repair could help to clarify the mechanisms
78 that cause this damage.

79 The comet assay has many advantages compared to other cytological
80 genotoxic evaluation methods: it allows the qualitative and quantitative
81 detection of low levels of DNA damage in any type of eukaryotic cell; it is a
82 quick technique and can be performed with a low number of cells. In aquatic
83 environments, most comet assays have been performed using *in vitro* systems,
84 while many others have focused on invertebrates, particularly using filter
85 feeding organisms like marine (Châtel et al., 2012; Kolarević et al., 2016) and
86 freshwater (Frenzilli et al., 2009) bivalves. It is important to note that the comet
87 assay measures direct and indirect DNA damage, and can be used to estimate

88 the extent of DNA breaks, which itself reflects the number of damaged cells and
89 the severity of damage. Thus, it is necessary to also account for mitochondrial
90 or membrane damage that can cause extensive DNA fragmentation via
91 apoptosis or necrosis (de Lapuente et al., 2015).

92 Therefore, we have analyzed the transcriptional activity of the genes *ATM*,
93 *DECAY*, *NLK*, and *XRCC1*, because of their putative relationship with genotoxic
94 effects. ATM (ataxia-telangiectasia mutated) is a protein that is mediated in
95 response to DNA double-strand breaks (DSB) and has a number of important
96 roles in the cell (Guleria and Chandna, 2016; Iijima et al., 2008), while DECAY
97 (death executioner caspase related to Apopain/Yama) is a key factor in
98 canonical apoptotic signaling, since it shares homology with mammalian
99 caspase 3 and caspase 7 (Dorstyn et al., 1999). NLK (NEMO-like kinase) was
100 described as a tissue-specific factor that regulates the activity of several signal
101 transduction pathways, including Wnt/ β -catenin, Notch and Bmp (bone
102 morphogenetic protein) signaling and it is the first member of a family of
103 proteins known as NEMO-like kinases (NLK) (Ishitani and Ishitani, 2013).
104 Recently, NLK has been related with DNA damage repair mechanisms because
105 it is required for p53 activation in response to DNA damage (Zhang et al.,
106 2014). Finally, X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1) is a base excision
107 repair (BER) enzyme involved in the core processes of single strand break
108 repair, simulating endonuclease action. It also acts as a scaffold protein in the
109 subsequent restoration of the site (Brem and Hall, 2005; Hanssen-Bauer et al.,
110 2012).

111 *Chironomus riparius* is a species widely used in ecotoxicology, and has been
112 selected as an organism for investigating the potential endocrine disrupting

113 effects of chemicals and as a reference organism in standardized protocols
114 (OECD, 2004a; OECD, 2004b; OECD, 2010; OECD, 2011). Exposure to some
115 well-known endocrine disruptors, such as DEHP (bis(2-ethylhexyl)phthalate),
116 cadmium, and some UV filters, produced changes in the activity of different
117 genes, showing that these compounds greatly affect the expression of genes,
118 particularly those related to hormonal pathways (Herrero et al., 2016; Herrero et
119 al., 2017; Ozáez et al., 2016). On the other hand, preliminary studies have been
120 performed about the genotoxic effects of some compounds in this species and
121 related species (Lee et al., 2009; Nair et al., 2011; Park and Choi, 2009)
122 showing genotoxic effects on aquatic organisms.

123 In a previous study, we showed that Vz can interfere with genes related to the
124 endocrine system, ecdysone metabolism, the detoxification mechanism, and the
125 stress response (Aquilino et al., 2016). The aim of the present study is to
126 evaluate the genotoxic effects of Vz, and the possible mechanisms involved in
127 this response at the molecular and cellular level in *C. riparius*. The comet assay
128 was performed to investigate the level of DNA damage in terms of strand
129 breaks and alkali labile sites, while real-time PCR was used to analyze the
130 mRNA levels of several genes involved in the DNA damage response.

131 **Material and Methods**

132 *Animals*

133 Fourth instar larvae of the midge *Chironomus riparius* were the experimental
134 animals. Stock cultures were reared under standard laboratory conditions in the
135 Laboratory of Biology and Environmental Toxicology (UNED) for several
136 generations, according to OECD guidelines (OECD, 2004a; OECD, 2004b;

137 OECD, 2010; OECD, 2011). Larvae were grown from egg masses in aqueous
138 culture medium (0.5 mM CaCl₂, 1 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 0.1 mM NaHCO₃,
139 and 0.025 mM KH₂PO₄) supplemented with nettle leaves, commercial fish food
140 (TetraMint), and cellulose tissue in 6 L polyethylene tanks. Cultures were
141 maintained under constant aeration at 20°C and under standard light-dark
142 periods (16L: 8D).

143 *Treatments*

144 For experimental treatments fourth instar larvae were exposed to 20 and 200
145 µg/L of Vinclozolin (Vz; CAS No. A 50471-44-8, purity ≥ 99%) from Sigma-
146 Aldrich (Germany) diluted in 30 mL culture medium without sediment (glass
147 vessels were used to carry out the exposures). Three different experiments of n
148 = 13 per treatment for the genotoxicity assay, and n = 9 per treatment for the
149 expression analysis. The duration of the treatment was 24 hours for both
150 assays. The untreated control larvae were exposed to the same concentration
151 of solvent (acetone 0.1%).

152 *Comet assay*

153 The comet assay was performed following a modified version of the method of
154 Singh et al. (1988). Thirteen larvae were homogenized over gauze and
155 resuspended in 3 mL 1x PBS. The homogenate was centrifuged for 5 minutes
156 at 1500 rpm at 4°C. Pellet was resuspended in 250 µL of PBS 1x. From the cell
157 suspension (10⁴ cells/mL), 10 µL was mixed with 100 µL of 1% low melting
158 point (LMP) agarose and 75 µL of this mix were spread onto a 3-well
159 microscope comet slide (Cell Biolabs) and the gel was solidified for 1 hour at
160 4 °C. Cells were lysed with lysis buffer (10 mM TrisHCl, 100 mM EDTA, 2.5 M

161 NaCl, 10% DMSO, 10% Triton X-100, pH 10) for 1 hour at 4°C. Subsequently,
162 the cells were exposed to alkali buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13)
163 for 30 minutes at 4°C to allow the unwinding of DNA. The microscope slides
164 were exposed to an electric field of 1 V/cm and 300 mA for 20 minutes in an
165 electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA). Slides were washed three
166 times in dH₂O for 5 minutes each, and then in 70% ethanol for 5 minutes.
167 Finally, slides were dehydrated and stained with Vistagreen (Cell Biolabs) for 15
168 minutes and observed in a fluorescence microscope. A total of 450 cells were
169 scored (150 cells per treatment from each of three replicate slides). The slides
170 were examined under a Zeiss Axiophot photomicroscope equipped with an
171 epifluorescence system and a Carl Zeiss Microscopy GmbH camera. Fifty
172 images were randomly selected from each slide and analyzed using
173 CometScore 1.5 software (TriTek Corp.). The medians for DNA damage was
174 expressed as the tail moment (tail length × tail %DNA/100), olive moment (OM)
175 ([tail mean - head mean] × tail %DNA), % of DNA in tail, and tail area.

176 *Sequence identification*

177 The nucleotide sequences for *ATM*, *DECAY*, *NLK*, and *XRCC1* were obtained
178 from Sequence Read Archive database. A file including all the sequences from
179 the project SRX147945 (Marinković et al., 2012) was downloaded and used to
180 run a systematic search in the GenBank database with the Blast2GO tool
181 (Conesa et al., 2005). The conditions of the search were: tblastx program, non-
182 redundant database and Blast Expect value of 1.0E-3. Sequences identified as
183 belonging to the gene of interest were used to perform a second search in Blast
184 using the blastn program and Transcriptome Shotgun Assembly database. The
185 sequences identified were translated with SnapGene software (GSL Biotech

186 LLC), and the proteins were compared using the blastp tool to confirm that
187 sequences corresponded to the selected gene. Sequences are included in the
188 supplementary material.

189 *RNA isolation*

190 The total RNA was extracted from individual frozen larvae using TRizol
191 Reagent (Invitrogen, Germany), following the manufacturer's instructions as
192 described in previous work (Aquilino et al., 2016). The quality and quantity of
193 the total RNA was determined by agarose gel electrophoresis and absorbance
194 spectrophotometry (Bio-photomer Eppendorf). Finally, the purified RNA was
195 stored at -80°C.

196 *cDNA synthesis and real time (RT-PCR)*

197 Reverse transcription were performed with aliquots of 0.5 µg of isolated RNA
198 using M-MLV RT enzyme (Invitrogen), following the manufacturer's instructions
199 in a final reaction volume of 20 µL. The obtained cDNA was used as template in
200 Real Time PCR reaction using Quantimix easy probes kit (Biotools) with a
201 CFX96 thermocycler (BioRad). The glyceraldehyde-3-phosphate
202 dehydrogenase (GAPDH) and ribosomal protein L13 (rpL13) genes were
203 employed as endogenous reference controls (Martínez-Guitarte et al., 2012).
204 PCR efficiency was assessed using a standard curve with the template diluted
205 1:2 in five steps, with the same PCR conditions. The efficiencies are listed in
206 Table 1. The qRT-PCR was run using the following cycling conditions: an initial
207 denaturation at 95°C for 30 seconds, followed by 39 cycles of 95°C denaturation
208 for 5 seconds, 58°C annealing for 15 seconds and 65°C elongation for 10
209 seconds. To verify the accuracy of each amplicon, a melting curve analysis was

210 performed after amplification. The BioRad CFX Manager 3.1 software was used
 211 to determine the total mRNA levels by normalizing the gene expression ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)
 212 against two endogenous reference genes. Each sample was run in duplicate
 213 wells, and three independent replicates were performed for each experiment.

Name	Sequence	Efficiency (E%)
ATM F ATM R	AAGTGCTACTTTATGATCCAATGT TGTACACAATTTAATGCACGA	97.3
DECAY F DECAY R	AAAGTGTTCCGATTATGGC TTCACACCAGTTAAAATCCAC	104.3
NLK F NLK R	CATCTCACCAGATCGTCTCT GAATTTATTTGATTATGCGGC	105.7
XRCC1 F XRCC1 R	GACGATTTGCATTGGATAGT ATCAACATATCGCCATCAG	100.9

214 Table 1. Primers used and their efficiencies in real-time PCR.

215 *Statistical analysis*

216 Statistical analyses were performed using SPSS 22 software (IBM). Normal
 217 distribution and variance homogeneity of data were assessed with the
 218 Kolmogorov-Smirnov and Levene tests, respectively. For normally distributed
 219 data, significant differences were compared using ANOVA (% DNA in tail, olive
 220 moment, tail area, and tail moment), while for non-normally distributed data, the
 221 non-parametric Kruskal-Wallis test was used (*ATM*, *DECAY*, *NLK*, *XRCC1*),
 222 discarding the higher and lower valued results obtained in the control and
 223 vinclozolin treatments (n = 7). A significance level of $p \leq 0.05$ (*) was used. For
 224 both cases (comet assay and gene expression) the results are expressed as
 225 the mean and standard error of mean (SEM) of three independent experiments.

226 **Results**

227 *Genotoxicity of Vz*

228 Nuclear DNA damage was evaluated by comet assay under alkaline conditions,
229 measuring different parameters that reflect the extent of DNA breakage induced
230 by Vz compared with the untreated larvae. DNA migration depends on the
231 length of strand breaks. Both concentrations of Vz (20 and 200 µg/L) increased
232 DNA damage measured for all parameters (% DNA in tail, OM, tail area, and tail
233 moment), showing statistically significant differences between treated and
234 control larvae (Figure 1). Both concentrations of Vz induced similar response for
235 % DNA in tail, a parameter related to break frequencies and also to the extent
236 of damage (Langie et al., 2015). On the other hand, the tail moment, which
237 incorporates relative measurements of the smallest size of migrating DNA and
238 the number of broken pieces, showed a dose-response relationship similar to
239 that observed for OM, and tail area also showed a dose-response relationship.
240 OM is a combined measurement of the distance between the center of both tail
241 and head multiplied by % DNA in tail providing information about DNA
242 migration. It reduces subjectivity and the method variability, being one of the
243 most commonly used parameters. However, it is measured in arbitrary units and
244 different image analysis systems can give different values. Finally, tail area
245 describes the number of pixels in the tail. In summary, all the measurements
246 performed showed the induction of DNA breaks providing the first evidence of
247 putative genotoxic damage on the freshwater invertebrate *Chironomus riparius*
248 by exposure to Vz.

249 *Gene identification*

250 A second step to perform this study was to identify genes related to DNA
251 damage: *ATM*, which is activated by double strand breaks (DSB); *DECAY*,

252 which codes for a caspase in the same pathway as the executioner caspase;
253 *NLK*, which has recently been implicated in DNA repair, although it has also
254 been related to the regulation of a number of signal transduction pathways; and
255 *XRCC1* (X-ray repair cross complementing) gene that codes a protein involved
256 in single strand break repair. A systematic search was performed using different
257 tools and databases to localize sequences that code for open reading frames
258 (ORFs) for these proteins, which are involved in DNA repair mechanisms and
259 other cellular processes that could be affected when genotoxic damage occurs.
260 One sequence was complete (*NLK*) and three were incomplete (*ATM*, *DECAY*
261 and *XRCC1*). Table 2 shows the accession numbers, the lengths of ORFs and
262 the closest match in the database. The relevant domains of each ORF are
263 presented in Figure 2. One sequence with a complete ORF of 421 aa (amino
264 acids) was obtained (*NLK*). It had a serine/threonine kinase domain associated
265 with NEMO-like kinases, and the protein showed very strong homology to the
266 NEMO protein from *Drosophila melanogaster*. Altogether, these data suggest
267 that this sequence coded for *NLK* in *C. riparius*. On the other hand, three
268 sequences with incomplete ORFs were identified (*ATM*, *DECAY* and *XRCC1*).
269 The first incomplete ORF corresponded to the C-terminal region of a protein
270 with a catalytic domain of ataxia telangiectasia mutated (*ATM*). Comparison
271 with GenBank confirmed that the fragment was homologous to the C-terminal
272 region of an *ATM* isoform of the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. The sequence
273 was 1294 bp and the ORF only covered the last 415 aa of this large protein.
274 The second incomplete ORF, identified as *DECAY* covered the whole 786 bp.
275 Database comparison showed that this fragment of 262 aa was homologous to
276 *DECAY*, a caspase from *Drosophila melanogaster*. A caspase characteristic

277 domain, CASc, was present in the central region of the fragment supporting that
 278 this ORF codes for DECAY in *C. riparius*. The last incomplete sequence was
 279 1647 bp long and coded for an ORF of 531 aa. Two domains, XRCC1 N and
 280 BRCA1 C terminus (BRCT), can be identified. XRCC1, a protein with a relevant
 281 role in DNA repair, is characterized by these two domains (London, 2015).
 282 XRCC1 N binds a DNA polymerase, while the BRCA1 C terminus (BRCT)
 283 domain interacts with DNA ligase III. The homology with *Musca domestica*
 284 XRCC1 suggests that only a small fragment of the protein was missing.

Acc N°	ORF coded	Species	Identity/Homology
KA178505	NEMO-like kinase (NLK) (421 aa)	<i>Drosophila melanogaster</i> NEMO, isoform A (414 aa) NP_729319	96%/98%
KA186164	ATM (C-terminal fragment 415 aa)	<i>Stomoxys calcitrans</i> serine/threonine-protein kinase ATM isoform X2 (2781 aa) XP_013106382	52%/67%
KA181636	DECAY (Internal fragment 262 aa)	<i>Drosophila melanogaster</i> Death executioner caspase related to Apopain/Yama (DECAY) (380 aa) NP_477462	39%/58%
KA184785	XRCC1 (N-terminal fragment 531 aa)	<i>Musca domestica</i> DNA repair protein XRCC1 (562 aa) XP_005187845	39%/57%

285 Table 2. Accession number, size of the ORFs coded, and the proteins with the
 286 highest sequence homology with each ORF are shown.

287 *Effects of Vinclozolin on DNA damage-related genes.*

288 Four genes involved in DNA repair and related pathways were analyzed by real-
 289 time PCR. The *ATM* gene showed statistically significant downregulation after
 290 exposure to 200 µg/L of Vz for 24 h of exposure (Figure 3). Nevertheless, the
 291 highest expression of the *ATM* gene was observed at the lowest concentration
 292 (20 µg/L), showing statistically significant upregulation compared with the
 293 control, although small differences were observed. The mRNA levels of *XRCC1*

294 had a similar tendency to that observed for *ATM*, significantly upregulated at the
295 lowest concentration of 20 µg/L and downregulated at 200 µg/L. On the other
296 hand, *NLK* showed a dose-response relationship curve, and a statistically
297 significant decrease with both concentrations was observed. Finally, *DECAY*
298 expression was maintained at control levels, and no statistically significant
299 effects were observed after exposure to Vz. Our data showed that Vz altered
300 the transcriptional activity of DNA repair related genes (*ATM*, *NLK* and *XRCC1*),
301 while it did not appear to activate apoptosis since *DECAY* was not affected.
302 Furthermore, DNA repair genes were differentially affected depending on the
303 concentration used.

304 **Discussion**

305 To date, there have been few studies assessing the genotoxic effects of
306 Vinclozolin on invertebrates and studies of this compound in freshwater
307 ecosystems remain scarce. The effects of Vz have been described in Medaka
308 (Sun et al., 2016) and Zebrafish (Lor et al., 2015), and in some invertebrates. It
309 has been described that Vz produced demasculinization in males of the
310 copepod *Acartia tonsa* (Watermann et al., 2016), morphological alterations in
311 the rotifer *Brachionus calyciflorus* Palla (Alvarado-Flores et al., 2015), altered
312 male accessory sex organs in *Marisa* sp. (Tillmann et al., 2001) as well as both
313 fecundity and fertility in *Lymnaea stagnalis* adults (Ducrot et al., 2010), and it
314 induced differential gene expression in the amphipod *Hyalella azteca* (Wu et al.,
315 2014). While most Vz studies have focused on its antiandrogenic activity, only a
316 few studies have explored its genotoxic effects. To determine these effects, the

317 present study investigated the genotoxic effects of Vz on *C. riparius* larvae at
318 the molecular and cellular level.

319 Previous studies showed that Vz produced a pronounced co-mutagenic effect in
320 the BaP-micronucleus through altered gene expression of human cell lines (Wu
321 et al., 2005). MN induced by Vz was also observed in the gastropod *Physa*
322 *acuta* (Sánchez-Argüello et al., 2012) and the rotifer *Brachionus calyciflorus*
323 (Zavala-Aguirre et al., 2007). Using the comet assay, we showed that Vz
324 produced DNA damage in *Chironomus riparius* cells, even after short exposure
325 times, confirming that this EDC damages DNA. Both concentrations tested
326 increased the DNA strand breaks, and a large comet is visible at the maximum
327 concentration (200 µg/L). Alkaline electrophoresis was used to show double
328 strand breaks (DSB), so the comet assay results suggest that DNA damage
329 was mainly DSB. The upregulation of *ATM*, the gene that codes for a protein
330 mediating the response to DNA double strand breaks, seems to corroborate this
331 possibility. However, the upregulation of *XRCC1* suggests that single strand
332 breaks (SSB) could also be possible. Therefore, Vz could work as a genotoxic
333 compound producing single and double DNA breaks.

334 On the other hand, it has been demonstrated that *NLK* is required for p53
335 activation in response to DNA damage (Zhang et al., 2014). The downregulation
336 of *NLK* could reflect that p53 pathways were negatively affected in response to
337 DNA damage, thus activating apoptosis. However, the response observed with
338 *DECAY*, a gene that codes for a death executioner caspase, suggested that
339 apoptosis was not activated, at least in the time tested. It cannot be excluded
340 that downregulation of *NLK* could be related with other pathways regulated by
341 this protein, as it also participates in other processes (Ishitani and Ishitani,

342 2013). Therefore, our results point to the lowest concentration of Vz tested
343 being able to activate the DNA repair response to DSB and SSB. The highest
344 concentration of Vz produced a general inhibition of the DNA damage related
345 genes when compared with the lowest concentration, while *DECAY* remained
346 steady for both tested concentrations. These results may reflect massive
347 damage on DNA that would not allow transcription. Although no statistical
348 significance can be observed for *DECAY*, a trend for downregulation can be
349 observed with 200 µg/L of Vz.

350 Taking the results into account, it can be proposed that two different scenarios
351 were in progress depending on the Vz concentration. With the lowest
352 concentration, an extensive effect seems to be compensated by the cell
353 activating the DNA repair mechanisms. On the other hand, the highest
354 concentration of Vz induced extensive DNA damage for which the cells could
355 not compensate, and the expression of genes involved in the response was
356 also affected.

357 Overall, our data show the early effects of Vz at the molecular and cellular level,
358 confirming it is able to induce transcriptional activation of genes involved in DNA
359 repair mechanisms and genotoxicity only 24 h after exposure at low
360 concentrations. The effects of Vz are clearly demonstrated on a suite of genes
361 related to DNA damage, which are essential for the proper maintenance and
362 survival of the cell under chemical stress conditions. However, further research
363 is needed to fully understand the mechanisms involved and the extent of the
364 damage produced to the cell by Vz.

365 **Conclusions**

366 The present work identified three partial and one complete mRNA sequences
367 that code for *ATM*, *DECAY*, *NLK* and *XRCC1*, which are related to the repair of
368 DNA and apoptosis at different levels. This work also shows for the first time in
369 the aquatic midge *C. riparius* the genotoxic effects induced by Vz. Analysis of
370 mRNA levels in larvae exposed to VZ revealed that Vz is able to differentially
371 modulate expression: the lower concentration used produced a significant
372 induction of the genes *ATM*, *NLK* and *XRCC1*, while the higher concentration
373 induced downregulation of those genes. On the other hand, the comet assay
374 was analyzed to detect single and double strand breaks, and showed clear
375 induction of a DNA damage dose-response relationship. Although further
376 research is needed to elucidate the mechanisms triggered by Vz to provoke the
377 genotoxic effects, our results reflect clear DNA damage and a rapid response of
378 the cell attempting to compensate for it.

379 **Acknowledgements**

380 This work was supported by the *Plan Nacional de Investigación Científica,*
381 *Desarrollo e Innovación Tecnológica* (Spain), grant CTM2012-37547 from the
382 *Ciencias y Tecnologías Medioambientales* program. The authors declare that
383 there are no conflicts of interest. M.A. is the receiver of a predoctoral contract
384 from the Ministry of Economy and Finance (BES-2013-064041).

385

386 **References**

- 387 Alvarado-Flores, J., Rico-Martínez, R., Adabache-Ortíz, A., Silva-Briano, M., 2015.
388 Morphological alterations in the freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas 1766
389 (Rotifera: Monogononta) caused by vinclozolin chronic exposure. *Ecotoxicology* 24,
390 915-925.
- 391 Anway, M.D., Leathers, C., Skinner, M.K., 2006. Endocrine disruptor vinclozolin induced
392 epigenetic transgenerational adult-onset disease. *Endocrinology* 147, 5515-5523.
- 393 Aquilino, M., Sánchez-Argüello, P., Martínez-Guitarte, J.L., 2016. Vinclozolin alters the
394 expression of hormonal and stress genes in the midge *Chironomus riparius*. *Aquatic*
395 *Toxicology* 174, 179-187.
- 396 Brem, R., Hall, J., 2005. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells.
397 *Nucleic Acids Research* 33, 2512-2520.
- 398 Châtel, A., Faucet-Marquis, V., Perret, M., Gourlay-Francé, C., Uher, E., Pfohl-Leszkowicz A.,
399 Vincent-Hubert, F., 2012. Genotoxicity assessment and detoxification induction in
400 *Dreissena polymorpha* exposed to benzo[a]pyrene. *Mutagenesis* 27, 703-711.
- 401 Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Robles, M., 2005. Blast2GO: a
402 universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research.
403 *Bioinformatics* 21, 3674-3676.
- 404 de Lapuente, J., Lourenço, J., Mendo, S.A., Borràs, M., Martins, M.G., Costa, P.M., Pacheco,
405 M., 2015. The comet assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature
406 tool that continues to expand its perspectives. *Frontiers in Genetics* 6, 180.
- 407 Dorstyn, L., Read, S.H., Quinn, L.M., Richardson, H., Kumar, S., 1999. DECAPY, a novel
408 *Drosophila* caspase related to mammalian caspase-3 and caspase-7. *The Journal of*
409 *Biological Chemistry* 274, 30778-30783.
- 410 Ducrot, V., Teixeira-Alves, M., Lopes, C., Delignette-Muller, M.L., Charles, S., Lagadic, L., 2010.
411 Development of partial life-cycle experiments to assess the effects of endocrine
412 disruptors on the freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*: a case-study with
413 vinclozolin. *Ecotoxicology* 19, 1312-1321.
- 414 El-Shahat, M.F., Al-Nawayseh, K.M., Jiries, A.G., Alnasir, F.M., 2003. Pesticides and heavy
415 metal distribution in southern Dead Sea basin. *The Bulletin of Environmental*
416 *Contamination and Toxicology* 71, 1230-1238.
- 417 Flick, B., Schneider, S., Melching-Kollmuss, S., Fussell, K.C., Gröters, S., Buesen, R., Strauss,
418 V., van Ravenzwaay, B., 2017. Investigations of putative reproductive toxicity of low-
419 dose exposures to vinclozolin in Wistar rats. *Archives of Toxicology* 91, 1941-1956.
- 420 Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., 2009. The comet assay for the evaluation of genotoxic
421 impact in aquatic environments. *Mutation Research* 681, 80-92.
- 422 Guleria, A., Chandna, S., 2016. ATM kinase: much more than a DNA damage responsive
423 protein. *DNA Repair* 39, 1-20.

- 424 Hagger, J.A., Depledge, M.H., Oehlmann, J., Jobling, S., Galloway, T.S., 2006. Is there a
425 causal association between genotoxicity and the imposex effect? *Environmental Health*
426 *Perspectives* 114(1), 20-26.
- 427 Hanssen-Bauer, A., Solvang-Garten, K., Akbari, M., Otterlei, M., 2012. X-ray repair cross
428 complementing protein 1 in base excision repair. *International Journal of Molecular*
429 *Sciences* 13, 17210-17229.
- 430 Herrero, Ó., Morcillo, G., Planelló, R., 2017. Transcriptional deregulation of genetic biomarkers
431 in *Chironomus riparius* larvae exposed to ecologically relevant concentrations of di(2-
432 ethylhexyl) phthalate (DEHP). *PLOS ONE*, 12, e0171719.
- 433 Herrero, Ó., Planelló, R., Morcillo, G., 2016. The ribosome biogenesis pathway as an early
434 target of benzyl butyl phthalate (BBP) toxicity in *Chironomus riparius* larvae.
435 *Chemosphere* 144, 1874-1884.
- 436 Hoffmann, F., Kloas, W., 2016. p,p'-Dichlordiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE) can elicit
437 antiandrogenic and estrogenic modes of action in the amphibian *Xenopus laevis*.
438 *Physiology & Behavior* 167, 172-178.
- 439 Iijima, K., Ohara, M., Seki, R., Tauchi, H., 2008. Dancing on damaged chromatin: functions of
440 ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 complex in cellular responses to DNA damage.
441 *Journal of Radiation Research* 49, 451-464.
- 442 Ishitani, T., Ishitani, S., 2013. Nemo-like kinase, a multifaceted cell signaling regulator. *Cellular*
443 *Signalling* 25, 190-197.
- 444 Jedeon, K., Berdal, A., Babajko, A., 2016. Impact of three endocrine disruptors, Bisphenol A,
445 Genistein and Vinclozolin on female rat enamel. *Bulletin du Groupément International*
446 *pour la Recherche Scientifique en Stomatologie & Odontologie* 53, e28.
- 447 Kavlock, R., Cummings, A., 2005. Mode of action: inhibition of androgen receptor function—
448 vinclozolin-induced malformations in reproductive development. *Critical Reviews in*
449 *Toxicology* 35, 721-726.
- 450 Kiparissis, Y., Metcalfe, T.L., Balch, G.C., Metcalfe, C.D., (2003) Effects of the antiandrogens,
451 vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka
452 (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol*, 63, 391-403.
- 453 Kolarević, S., M. Kračun-Kolarević, J. Kostić, J. Slobodnik, I. Liška, Z. Gačić, M. Paunović, J.
454 Knežević-Vukčević & B. Vuković-Gačić (2016) Assessment of the genotoxic potential
455 along the Danube River by application of the comet assay on haemocytes of freshwater
456 mussels: The Joint Danube Survey 3. *Sci Total Environ*, 540, 377-85.
- 457 Langie, S.A., Azqueta, A., Collins, A.R., 2015. The comet assay: past, present, and future.
458 *Frontiers in Genetics* 6, 266.
- 459 Lee, S.W., Kim, S.M., Choi, J., 2009. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater
460 crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to
461 screen the ecological risks of nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and*
462 *Pharmacology* 28, 86-91.

463 Lioi, M.B., Scarfi, M.R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Salvemini, F., Di Bernardino, D.,
464 Ursini, M.V., 1998. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human
465 lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636.
466 Environmental and Molecular Mutagenesis 32, 39-46.

467 London, R.E., 2015. The structural basis of XRCC1-mediated DNA repair. DNA Repair 30, 90-
468 103.

469 Lor, Y., Revak, A., Weigand, J., Hicks, E., Howard, D.R., King-Heiden, T.C., 2015. Juvenile
470 exposure to vinclozolin shifts sex ratios and impairs reproductive capacity of zebrafish.
471 Reproductive Toxicology 58, 111-118.

472 Marinković, M., de Leeuw, W.C., de Jong, M., Kraak, M.H., Admiraal, W., Breit, T.M., Jonker,
473 M.J., 2012. Combining next-generation sequencing and microarray technology into a
474 transcriptomics approach for the non-model organism *Chironomus riparius*. PLOS ONE
475 7, e48096.

476 Martínez-Guitarte, J.L., Planelló, R., Morcillo, G., 2012. Overexpression of long non-coding
477 RNAs following exposure to xenobiotics in the aquatic midge *Chironomus riparius*.
478 Aquatic Toxicology 110-111, 84-90.

479 Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2013. Genotoxic effects of
480 environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated
481 using the comet assay. Mutation Research 758, 41-47.

482 Nair, P.M., Park, S.Y., Lee, S.W., Choi, J., 2011. Differential expression of ribosomal protein
483 gene, gonadotrophin releasing hormone gene and Balbiani ring protein gene in silver
484 nanoparticles exposed *Chironomus riparius*. Aquatic Toxicology 101, 31-37.

485 OECD, 2004a. Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment.
486 Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

487 OECD, 2004b. Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water.
488 Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

489 OECD, 2010. Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked
490 Water or Spiked Sediment. Organisation for Economic Co-operation and Development,
491 Paris.

492 OECD, 2011. Test No. 235: *Chironomus* Sp., Acute Immobilisation Test. Organisation for
493 Economic Co-operation and Development, Paris.

494 Ozáez, I., Aquilino, M., Morcillo, G., & J. L. Martínez-Guitarte (2016) UV filters induce
495 transcriptional changes of different hormonal receptors in *Chironomus riparius* embryos
496 and larvae. Environ Pollut, 214, 239-47.

497 Park, S. Y. & J. Choi (2009) Genotoxic effects of nonylphenol and bisphenol A exposure in
498 aquatic biomonitoring species: freshwater crustacean, *Daphnia magna*, and aquatic
499 midge, *Chironomus riparius*. Bull Environ Contam Toxicol, 83, 463-8.

500 Sánchez-Argüello, P., N. Aparicio & C. Fernández (2012) Linking embryo toxicity with genotoxic
501 responses in the freshwater snail *Physa acuta*: single exposure to benzo(a)pyrene,

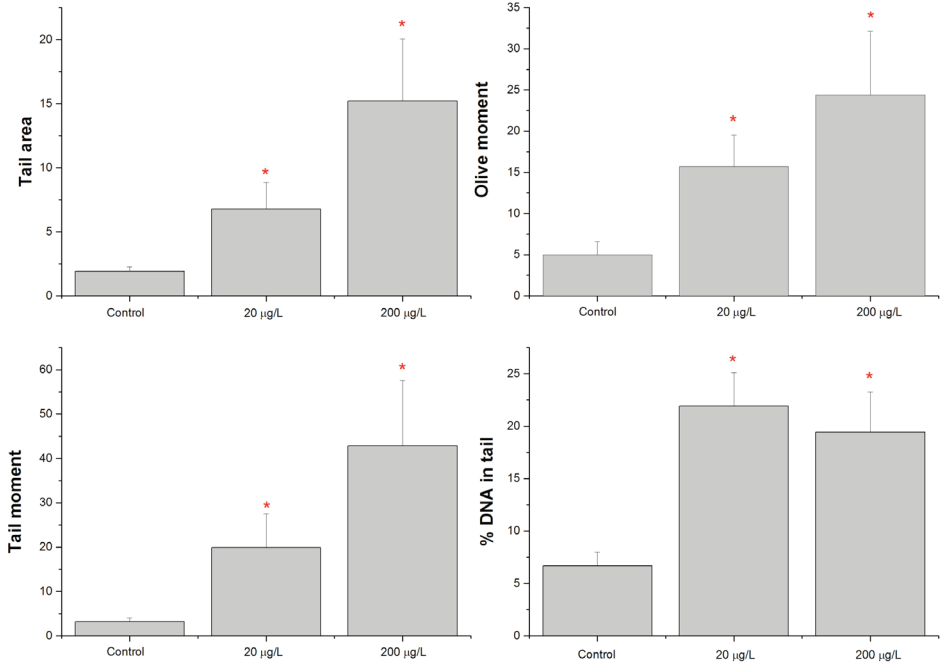
- 502 fluoxetine, bisphenol A, vinclozolin and exposure to binary mixtures with
503 benzo(a)pyrene. *Ecotoxicol Environ Saf*, 80, 152-60.
- 504 Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice & E. L. Schneider (1988) A simple technique for
505 quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell*
506 *Research* 175, 184-191.
- 507 Sun, L., Peng, T., Liu, F., Ren, L., Peng, Z., Ji, G., Zhou, Y., Fu, Z., 2016. Transcriptional
508 responses in male Japanese medaka exposed to antiandrogens and
509 antiandrogen/androgen mixtures. *Environmental Toxicology* 31, 1591-1599.
- 510 Tillmann, M., Schulte-Oehlmann, U., Duft, M., Markert, B., Oehlmann, J., 2001. Effects of
511 endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory.
512 Part III: cyproterone acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicology* 10, 373-
513 388.
- 514 Watermann, B.T., Albanis, T.A., Galassi, S., Gnass, K., Kusk, K.O., Sakkas, V.A., Wollenberger,
515 L., 2016. Effects of anti-androgens cyproterone acetate, linuron, vinclozolin, and p,p'-
516 DDE on the reproductive organs of the copepod *Acartia tonsa*. *Journal of Environmental*
517 *Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*
518 51, 1111-1120.
- 519 Wu, X.J., Lu, W.Q., Roos, P.H., Mersch-Sundermann, V., 2005. Vinclozolin, a widely used
520 fungicide, enhanced BaP-induced micronucleus formation in human derived hepatoma
521 cells by increasing CYP1A1 expression. *Toxicology Letters* 159, 83-88.
- 522 Wu, Y.H., Wu, T.M., Hong, C.Y., Wang, Y.S., Yen, J.H., 2014. Screening differentially
523 expressed genes in an amphipod (*Hyalella azteca*) exposed to fungicide vinclozolin by
524 suppression subtractive hybridization. *Journal of Environmental Science and Health.*
525 *Part B, Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes* 49, 856-863.
- 526 Zavala-Aguirre, J.L., Torres-Bugarin, O., Zamora-Perez, A.L., 2007. Aquatic ecotoxicology
527 approaches in Western Mexico. *Journal of Environmental Science and Health. Part A,*
528 *Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 42, 1503-1511.
- 529 Zhang, H.H., Li, S.Z., Zhang, Z.Y., Hu, X.M., Hou, P.N., Gao, L., Du, R.L., Zhang, X.D., 2014.
530 Nemo-like kinase is critical for p53 stabilization and function in response to DNA
531 damage. *Cell Death Differentiation* 21, 1656-1663.
- 532

533 **Figure 1.** Induced DNA damage measured in *Chironomus riparius* after exposure to 20 µg/L
534 (69.9 nM) and 200 µg/L (699 nM) of Vz for 24 h. The results were expressed as tail area, olive
535 moment, tail moment and % DNA in tail. The mean ± SE are shown for measurements taken in
536 three independent experiments (n = 13 larvae), each with three replicates. *Significant
537 differences ($p \leq 0.05$).

538 **Figure 2.** Diagram of the protein of *Chironomus riparius* identified as putative mRNAs and their
539 conserved domains. NEMO-like kinase (NEMO) is 421 aa in length. Ataxia-telangiectasia
540 mutated (ATM) is 415 aa in length. Death executioner caspase related to Apopain/Yama
541 (DECAY) is 262 aa in length. X-ray repair cross complementing is 531 aa in length. Diagram
542 designed with DOG V.2 software.

543 **Figure 3.** The transcript levels were normalized using the mRNA levels of the *GAPDH* and
544 *rpl13* genes. Whisker boxes are shown. The number of larvae for each box is seven (n = 7).
545 The horizontal line within the box indicates the median. The boundaries of the box indicate the
546 25th- and 75th-percentiles, and the whiskers indicate the highest and lowest results. The mean
547 is indicated by the small circle inside the box. The treated larvae were compared to the control
548 larvae. *Significant differences ($p \leq 0.05$).

549



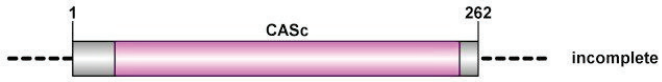
NLK



ATM

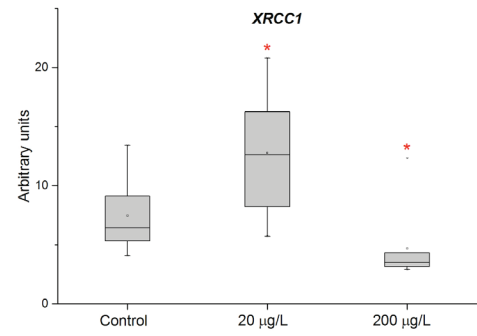
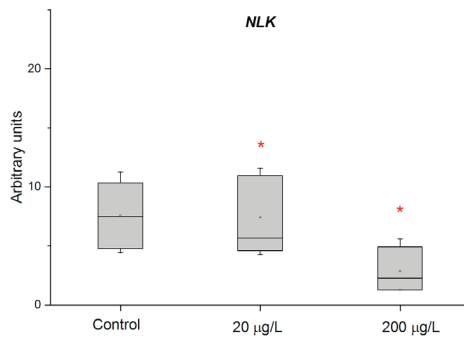
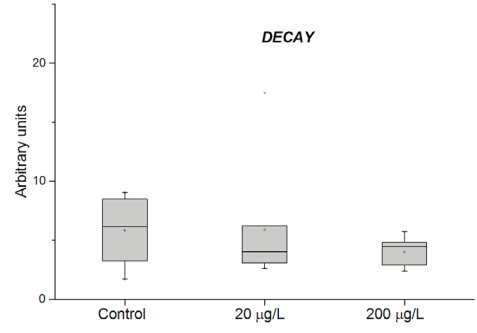
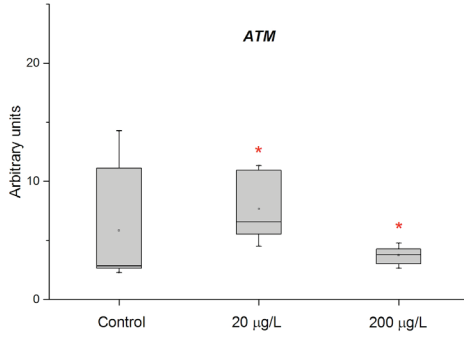


DECAY



XRCC1





Supplementary material

Nemo like kinase (NLK) (complete) 4496 bp

TSA: Chironomus riparius CripIT03793 mRNA sequence

GenBank: KA178505.1

GAAAAATTTGTAAAGCTGTTTTCTATTTGCTTTTCGTAAGGAAAGTGCATTATTCATATTTCTGTCTTATTGTAAGGCCAAATACATAAAAGAA
AAGAAAAAATAAATCGTGAGGAGACATAAAAAATTTTCATATAAACTTTTTTCAGTAATTAATAAGAAAGTTATCAAAGCAATTAATAAAAA
ATCTAATAGTGTGCATCAATAAGTGTGATTTATGTAATTCATCAATATTTGGATTACTTTTTACAACAAAAAGGAAATTAACAAGGAGCAAAAA
TCTGCAATATTTTATGAAAAAGAAGAAATAGAAAAAAATACAGCTCACATTTTATAAAAACAGCCACTTTAAAACATTTATTTTTGT
GATAGTCTTTTAGTGTGCGTTTTGTGTATATGTTTAGAGCTGCTTTTTCCAGCCAAGTGAATTACACTTAGTGAGATTAATAATAATATGCC
ACAGTAAAAATAAAGTTCCAAAAATATCAATAAGAAGTATAAAAAAAGAGTTGAAAAAAATGAAAAGCAATTTGTTAATAGTAGCAACAGCAG
TTACAGAGAGAAAAATATAAAAAAAGAAAGTAGTAACATCAGCAATCAGTAAAAATAATAATAATAGAGAAAAAAAGAAATGGAAATATAAC
AGTTCATTTTTATTGTTGTGCTTTTTTTATTTTTACACCCGGGAATTACAACTTTTTTGTGCTACCAATTAGCAATTTTCACTGTAATATCTCAA
GTCTATCGCGAAAAAATTAACATCATTGCATAGAGCAAAAGAAAGGAAAGCTGTTCTTACCCAAAAACAAGGAGAAATTAATAATTTAAA
GCTGGGTTTTATTGGTTATGGACAACAGTACGACGCTTCTGATGGCGCAGTTGGCCCTAGTCACAGATCGCGGGTCTCGATGTCACCTTCAAGG
AGGAGGGTGGCTCAATCAGCCACTGGAACCGTTTTGGCCGAGCTGCTCCCTATTATCAGCCTCCCAACATCCCTCAAGATGTACAGCCTGACCG
ACCAATCGGTTATGGTGTCTTCCGAGTTGTTTTGGCAGTGACAGATCCTCGAGATGGAGCTGAGTGGCACTTAAGAAGCTACCAATGTGTTTCA
ATCCTTTGCTCATCGAAAGCTGTTTTCAGGGAATGAAAATGTTGTTTCTTCAAGCAGCAAGATGTTCTATCAGCATTGGATATTTTTCAGCC
ACCCATTTGGACTTTTTCCAAAGAAATATATGTGATAACAGAAATTACTTCAATCAGATCTTATAAAATATTGTTGTCACCGCAACATTTGTCTGC
TGATCACATTAAGTATTTCTTTATCAGATTTTACGTGCTCCTCAATATTTACATTCAGCTCGCATTTCTATCGCGACATTAAGCCGGAAATTT
GCTTGTCAATAGCAATTTGTGCTTTAAATTTGGGATTTTGGACTTGTCTGTTGAAAGGCCGATCAAACTAAGCATATGACACAGAAGTGT
TACACAATATTCGTGCTCCGAAATATTGATGGCGCAAGCATTTATCAGCAGCTGTCGATGTATGGTCAGTTGGATGTATTTCCGGTGAATTT
ATTAGTGTGCTGATTAAGTTCGAAAGTCCAGTACCAAGCTGAAATTTGATAACTGAATTTATGGGAACCCCATCAATGGAGGATATGAA
ACACGCTTGCATGTTGCTCGAACGCATATGCTTCGGAGAGTGCCAAAGCCGCTTCAATTATCAGCATTATATACGTTAAGTTCACGCAACACA
TGAAGCTGTTCTCTGTTATGTCAATGCTTGTCTTCGATCCGGATAAAAGAAATATCAGTAATCGATGCTTTAGCACATCCATATCTCGATGAAGG
GCGATTACGTTATCATTCATGATGTCGAAATGTTGTTATACAACATCCGGTGAATGAGACAAATATACCGCTGATTTTGAACCTGCCGCAACACA
ACCTTTTGTGACTTATGGGAACGTAACCTCACTTCTGTGCAACAAGTTAAAGAGGAAATGCAAAATTTATAGCCGAACAGCTACAACCTGGTCTG
GTACCACGTGTATAAACCCCAATCTGCAGCTTTTAAAGCTTTGCAAGACAAAAGTAAATGAATTAAGAAAGAAATGAATGTCAAAAATACGA
AGAACATTTATTTCTTATAAAGTAAAAAAATACTGAGAAATGTAACATTTTCTCTTGAAAAAATGAAAAAAATGAAATAGTCTTAACAATAC
ACAGCCTATAAGTAAATGAATAAATGCCCCAATAATGTCGAAATTTACACATCGAAAAAATAATGTAACCTCAACTCTGATGAAATCAATAATAA
TCATCTCACCAGATCGTCTCTCTCTAGTTCAACTGTTGCTCATCCCTCAGAACTCCGCCATCACCGCATCAGTGGTCTTGAAGCTCTTCAAC
TATGATTCGCAAAAAATAATCCCAATCTCCGGGTCATATCCTCACACAAAAAACAACAAAAAACAATACTCACTACAAAAATTTAATATTT
TTTTCTGGCATTTCAATCATCTCGAAATGATGGAGATATGAAATATGGAAGTTCCTTCTTATTATTTTTTTTCTTTTACACATTAATAATCGATC
GACAACCTTTCTTCTGCTTTTCTCAGCCTTTAACCATATAGAAATTTATACACACAAAAACAACCAACAGTTTTTACCGTCAATAAACTAGT
CTCGCTTCGGGAAAAAATGATTAATAATGGAACATGATAAACAATCTTATAATGATGATGACAGTATGATAACTTTTTTTGCCAAAATC
TTTTAATGCACACACAATAGATAATCATTTCCGAAATTTGATGGCAACTTTAAAGTTTGAAGACAAAACCTGCTGCTCTAATTTTTTTTTATGTA
CATGACTCAGAAAAAGTAAAGAAATTTTTGTTTTGACATAATGAGAGTAAGAAATAATAACAATGTAATAGTTAATGTGAACAGAAAAATAGAA
TCAAGTTTCAATCCGTTTTTATTATTATTTCTCTTGAAAAAAATATTAGGTACATACACACTTATATACATAATATGAGCTTTAAAATGTAAGA
AAGAATGAAAGCTTTTTATTTCTGTAACCTTTTTGCAAGAACACTGCGGATAAAAAAATGAAGAACTTATGATACAGTTAAAAACAAGTACAGAA
TAATAAAATTCATGATTTTAAATTAAGTCTTTTTTTTTGCTCTACTGTGCTTGTCTTTTAAAAAACAAGAAATGAGGAAGTTTTATACCCGCCA
TCAAGCTGCTAAAAACAACATAAAAAAACTTTTTCTCACTGTGAAATTTTCTCGCTCAACAGAAATGATTAGTGTTTAGCAATTCAAATCAA
TGATTCTCATGAGAGATCCATAAAAAACAAAAAAATGAAAATGTTTTATGTGCGAGACAAACTTTTACGCTCTCGTTTTAGACAAGATAAAT
TATTCAAAACAAGAGAGTGAAGTAGAAATTAACAATAAATAATGATAATTTAGTGAACCTTTTACATGATAAAATCTAGCTTTTTTCGGAATTA
GCTCTGGTGAAGATTAGTCGGTATTTTAGCATTTTTGAGAAGCTTTTGGAAAGTTGAAGAAATTTGATATATAATTAATACTTAATCTTAAA
GTTTTAACCTTTGTTAGTAACGTTAAGACTAGGTGATAGCTAAGCATACATATACAAAAGCTACTATATTACAGCTAGGCAGCTTTCCAAAGGTT
CCAAATCTAATTTAACAATCGAATTCAAAAAAGTAAAAAATGTCATTAAGCGGAAAAATTAATCTTGCCTTAATTTGCTGATTTATGCTATAA
AGTTTTTTCAATGAATAATCATTTGATTCATAGCATAAAGCAGCGAATTTAGAACGCAAGCTTCTAATTTCAAAGATTTGAATAAAAAATACAT
AATTCAAAATTCAAAACCTCATGTTTTTACATGAATCCTAACCTTAAAAGTTCTGGATCATTTTATAAAATTTTCAAACATCTCGCAAAACC
CAAACCTGCCAAAACAACCCGAGCAATGTACTGATATTTCTAAAATCAAATCAGCTAATCTATGATTAACAAACGAAATTTGAAATTTATCTA
ATTAGGAAATTCGAATATCTTCTATGATGCTTCTTCTATGCTATTTTAAATCTCAAAATCTTCTAGACATTTCTGCGCCCTCAATATTAAT
GATCATCAAGCTGTTGTTGTCAGGGAATGAAAAAAGAAATAAAAAATAAAAAAATAAATAGTAGTAGTT

ORF (421 aa)

MAAVGPSHRSRVSMQLQGGVVAQSATGTVLAAAAPYQPPNI PQDVQPDRI GYGAFVWVAVTDPRDGRRVALKKLPNVFQSLVSSKRVFRELKM
LCFFKHENVLSALDLIQPHLDFQEIYVITELLQSDLHKIIVSPQHLSDHIKVFYLIQLRGLKYLHSARILHREDIKPGLLVNSNCVLIKICDFG
LARVEEVDQTKHMTQEVVTTYRAPEILMGRHYSAAVDVWVSGVICFPELLGRRIIFQAQSPVQQLLELITELLGTPSMEDMKHACDGARTHMLRRV
PKPPSLSALYTLSSHATHEAVHLLCQMLVFPDDRISVIDALAHPLYLDEGRRLYHSCMKCCYTTSGMQRQYADFEPAATQPPDDLWERKLTSVQ
QVKEEMHKFIAEQLOTGRVPLCINPQSAAFKSFARQK

XRCC1 (fragment) 1647 bpTSA: *Chironomus riparius* CriPIT10081 mRNA sequence.

GenBank: KA184785

NOTE: A "T" was inserted in position 871 to maintain the correct ORF after comparison with JXPV01025961 sequence from a genome project for *Chironomus riparius* in Whole Genome Sequence database

GGAAAACAAAAATAAATTTACAAATTCAGTTTTAACTTAATTTATTATAAGAAATGCCACAAATAACGAATGTACATTACACAGCTTCAGCAGC
 GAGGATCCTAATTTCCCGGCAAAAATTTGATAGAAACAAAATCACAAAGAAGTGGAAATGCGAGAAGCAGGTGAAAAGTTCAGTCTTCGTGATC
 CTTAAACTTGATAAGCCTTATAAATTTACACAAATAGACATAGGAAATGAATTTACAGGAGTTATTTGAGATATTGGTAGGAAATTCATGTTAGTG
 CCTCCAAAATTCGAAGAAATCATCTTTAGCCACAAGTCTAATGACTATTTTTGATGCTAAGAATGAGAGAAATCCAAATGGAGTAAGAATGTTTGG
 CGAGATCTGTTTTAATCCAGCTGTTGCTGATATAACAATGGGATCTTGTGATAAATAAATTTGCAGTCAGCCGTTCAATTAATCAACAGCAGTATGGCTTG
 TCATTCATTAATCTTACACAAATGAGGAAGTAACACCAATGATGATGATGATTCACCAATAAAGTCAAAGATTCCAAAGATCCAGTTGCCGTCA
 CAAGAAAAGACACCAAAAGTAGCTCCAAAAGCTACACAAAATTTGGCAAGTTTAGATTCAGAGACTCAAATTCAGAGATGAAGAGAAACGCTCA
 CCTTTTGCACAGTGGAAAAATAAGAAGATAATCCCACTCAACAACTCAAGAGTAACGCCAAAATCCGACACAAAATTCGATTAAGAGCA
 TTAAGGCAAAAATTTGAGTCAGAAAGTAAACGTAGAAAGTTGACGACGATGATGTTAAACACAGCAAAGTAAAACAAGACCGTAATCGATCGAAA
 GGTATTTATTTATGATAGCAGTGCAGATGAACCGAACGAGAACTTCAAAGAAAATCGAAAAGATAAGAAGTCAAAGTTCCACTCAAAAACAT
 CCAGTGAGGCCACCCCAACAAAATCATACCATCTACATCCAAATTTCTTCATCTCTAATGATGATGATGAAAGAAAAGATCTTCGGTATCA
 AGTCTCAAAGAAAATAAATTTAAAGATGAAGCAGTTCAACGCAAAAGAAAACCAATAAGGAAATTAATATAGACCTTTTAATAAGCTCATGGAA
 GCGGTACTTTTTGTAATAGTGGTTATCAAATCCAGAACGTGGCATAATTCGTCAAAAGCGCTTGGATGCGGTGCGAAAATCAAAAGCTGATGG
 GATGATACCTGTACTCATTTAATTTGTGCCTACAGCAACACTCCAAAATACAATCAAGTGAAGGAAAAGGCAAAAATTTCCGAAGAAATGGATT
 GAAAATTCGTTCAATGAGCAGAAAATGATTCATGGAGACGATTTGCATTGGATAGTACCGAAAAGAAACAAGTCAGAAAGTGAAGATGAAATTTCTT
 TGTGACTGGCACAACCAAGTCATCAACAGAGTCAAAGTGGAGAAAATGGAGCAATCGGATGATTCGATGGCGATATGTTGATTGTAGACTGT
 CGTGGACAGAAAGAAAGCAGCTAAAATATAATGATTCCGATTCGAAAGTGACATGGCAATTTGTGACAAAACACAAAATAATAATATTAAG
 ATAGATAAAATGGAC

ORF (531 aa)

MPQITNVTLHSFSSDPPNFPKLNLIETKIKKKWCKEKAGEKSVFVILKLDKPYKFTQIDIGNEFTGVIEILVGNLSMLVPPKFEEIILATSLMTIFD
 AKNERNPNGVRMFRGLDFNPAVADIQWDLVKIICSQPFNNHRQYGLSFINLHTNEEVPNDDDSDSPKISKIPIKIQLPSQEKTPKVPKATTKIKGF
 RFRDSNSDDEEETSPFAQWKNKNDPNHSTNSRVTPKSDTKFSIKEQLKAKLESESKRRKVDVDDVTKAVKQDRNRSKGLFYDSDDEPNEKQLK
 IEKDKELKSSQKHPVRPTPKSSPSTKSFSSFLNDDDERKRSSVSSPQRNKLKDESDSTQKKTNKEIKYRPFNKLMGCVTFVIVISQYQNPERRGIR
 QKALDMGAKYKADWDDTCHLILCAYSNTPKYNQVRGKGIIPKKWIENCFIEQKMIPIWRRFALDSTENKSESEDEILCDWHKPKSSTESKVEKME
 QSDSDGDMILVDCRGQKNDAKIIDSDESDEMAIVDKTKIIILRIDKMD

Decay (fragment) 786 bpTSA: *Chironomus riparius* CriPIT06922 mRNA sequence.

GenBank: KA181636

AAAAATAAAATCCAAAAGTTAAATACAGGATATACTTATAATGAATGAGGGTGTAAAAGAAAAGTTGAAGATGTGTTTTATAAAAAAATAC
 TGTGAAAAGCTGGAGAGCTATAATATCAATCAAATGAATTTGATGAACATGATCATCGATTTGGGTGCTTATAAGGATAGCGACAACCTAAAT
 ACAGTATTGAAAAGTTATGGATTAGAAGTGGAAACACATCTGATGCCACTAATGAAGAAATCGATGAGAAATAAAATTAGCATCTCGAGATGAT
 TACTCTGCATACAATTTGTTAATTTGTTATCATGATGCTCATGGAGATGAAAACAAAACATCTTTACAAGAGATGGTTGAGTTGAAGTAGATTCA
 CTATGGAATTTTTTACGGCGATAGATGTCCAACTCTTTGTGAAAACAAAATGTTTTTTTTTAAAGCTTGTGCGGATCGACACCTGACTTT
 GGTGCATTAATAGAGGAGCAAAAGCGATTTAATAAAAATCAAAGGAATCGTTGCAAGCAATACGGTGAAGTGCACAAAGTTCGGATTAAGCA
 GATATCTAGTCATGTTTTCAAGTGTGATGGATTTCCCTCATTAGAGAAGTAAACTATGGCTCATGTTTATAGAAAGCACTGTGTGAGGAGTTA
 AAGCATATTTAAAAATAATACAATCAAGATGTTGATTTAATGTGGATTTTAACTGGTGTGAATAGATATGTAGCATTTCAAAAGAGCTTAT
 GATCCAGAAGGAGATTCA

ORF (262 aa)

KNKNSKSLNTGYTYNELRVLEKVEDVYFNKNCEKAGRAIFNQIEFDEHDHRLGAYKSDNLSLNTVLSYGLVEVHTHTDATNEEIDEKCLKLASRDD
 YSAYNCLIVIMSHGDENKNIIFTRDGSVEVDSLWKFFTGDRCPTELCGPKLFFIQACRGSTPDFGALIEEQRFNKNQKESLQSNVSAQSVPIMA
 DILVLFSSADGFFSPREVNYGSWFIEALCEELKAYLKNNTIQDVLMLWILTGNVRYVAFSKEAYDPEGDS

ATM (fragment) 1294 bpTSA: *Chironomus riparius* CriPIT11460 mRNA sequence.

GenBank: KA186164

CCGCTGTTCTGGAGCCAAAAGATTTGTGGGAGACCTTAAAAAGATCATAAATCAATAAAGCCAATAATGATTGAAATGGAGAAAATGTGACGAGC
 ACTAATTAACCTGGCTAATATGCCATTAAGACATCATCTATTCCATCGGATCACAAGTATTGAAATGACAAAATTTAAAATATGCACACTGTCC
 AACAAATGATTTAACAGTTATGAGAAGTTGTAATATCAGAAAAGCTTAATAACAGTCCAAAATGGGATCCAAATGTAAAGTCAGTTGGTGGAAAT
 TAATGCACAAAAGAAATGAAGTTTGTGTTCTGATGGAATAAGAAGACCTCAATATTGAAAGGAAAAGGACGATATGCGTCAAGATGCAATTAT
 GGAACAAATATTGGAGTTGTAACAATTACTACTACGATAGAACAATGCAAAAAGAAATGCTAGAAATTAAGCAATATAAAGTTGTTCCATT

TTCTCGACGTTCTGGCATTTTAGAATGGTGTGCAAATACGACTCCAATTGGATGTTACTTAGCTGGAGAACGTGGGAGTGATGGACGAATCATTAA
TAAAGGTGCTCATGAAATTTATCGACCAAATGATTGGAGTCTGCTTTATGCATGCGTAAAAATATCAGAGATTCTGCAAATTTAGACAGTGATGA
TAAATTGGAAGTTTAAATGAAATTTGTGTGCGTATTAGCCTGTATTTCAACAATCTTTTATGAAAAATCAAAAATCCAGGACAACATTTTGA
ACGGAGATTTGCGTACACAATAAGTGTGCTGTTAGTTCATGATTGGATATATTTGGGTATTGGAGATCGTCATGTTCAAACATTTAATTGA
CTTAAAAACAGCAGAATTAATTCATATTGACTTTGGAGTGGCATTGAAACAAGTAAAATTTACCACATCCTGAATTGATCCATCCGCTAAC
GAGAGACATAATTGCACCATTTGGAGTCAGTGGAGTTGATGGAATCTTTAGAAGGCATGCGAAAAATACAATTGAAATTTACGTAAAAATGATAA
AGCATTAACGACAATTTGGAAGTGTACTTTATGATCCAATGTATATGTGGACATTTGGCGTAGATCAGGCACGACGATCTCAGTTGGAATGTGA
AAGTGATGATGATCTTTGGGTGAAAAGTTGAGCATGATTTGATGGCATCTCGTCATTAATTTGTGTACAAAATGAAATGAAAGGAATGGCTA
GAAAATACCTCCGTACGATATCCGCTCTATTGAAGACAAGTCCAAT

ORF (415 aa)

ACSWSQRFVGDLLKDKHSIKPIMIEKMSAALINLANMPLKTSSIPSDHKVLKLTNLKYAHCPTIDLTVMRSCNYQKSLITVQKWDPNVKSVGGI
NAPKRIEVLCSDBGIRRPQLLKGKDDMRQDAIMEQIFGVVNKLLLLDKNMQKNNARIRTYKVVPFRRSGILEWCANTTPIGCYLAGERGS DGRIIN
KGAHEIYRPNDWSPALCMRKISEIPANLDSDDKLEKFNEILCRIPVFHNFYEFKFNPGQHFERRFAYTISVAVSSMIGYILGIGDRHVQNILID
LKTAEIHIHIDFGVAFEQGIKILPHELI PFRLTRDIIAPFGVSGVDGIFRKACENTIEILRKNDKALTTILEVLLYDPMYMWTFGVDQARRS QLECE
SDDDLGGEKVEHDLMASRALNCVQNEIERNG



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Effects on tadpole snail gene expression after exposure to vinclozolin

Mónica Aquilino^{a,*}, Paloma Sánchez-Argüello^b, Marta Novo^{a,c}, José-Luis Martínez-Guitarte^a^a Grupo de Biología y Toxicología Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, UNED, Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain^b Laboratorio for Ecotoxicology, Department of the Environment, INIA, Crta A Coruña km 7, 28040 Madrid, Spain^c Biodiversity, Ecology and Evolution, Biological Sciences, Complutense University of Madrid, José Antonio Nováis sn, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Vinclozolin
Physella acuta
de novo transcriptome
 Biomarkers
 Detoxification mechanisms
 Stress response
 Endocrine related genes

ABSTRACT

The fungicide vinclozolin (Vz) is an endocrine disruptor with known anti-androgenic activity in vertebrates. However, there is a lack of information about the Vz mode of action in invertebrates, although some studies have shown that this compound can produce alterations in different species. Transcriptional activity was analyzed in the freshwater snail *Physella acuta* in order to elucidate putative cellular processes altered by this chemical during a response. In order to identify potential molecular biomarkers, a *de novo* transcriptome was generated for this species that constitutes a valuable source for future studies. This data, together with some already available data, permitted the identification of several genes related to detoxification mechanisms (*Cyp2u1*, *Cyp3a7*, *Cyp4f22*, *GSTo1*, *GST2*, and *MRP1*), stress response (*Hsp20.4*, *Hsp17*, *Hsp16.6*, and *Cu,Zn-SOD*), the hormonal system (*Estrogen Receptor* and *Hsp90*), apoptosis (*Casp3*), and copper homeostasis (*ATOX1*). Using quantitative Real-Time polymerase chain reaction, mRNA levels of these genes were examined in snails exposed to 20 or 200 µg/L Vz for 24 h. The results showed an overall weak response, with downregulation of *Hsp20.4* and no statistically significant change for the other genes. These findings suggest that *P. acuta* can manage the concentrations of Vz found in the environment with no relevant activation of the pathways analyzed, although additional studies are needed for longer exposure times and including other metabolic pathways. The new genes described open the range of processes that can be studied at the molecular level in toxicity tests.

1. Introduction

Currently, most human activities involve the dispersion of toxicants into the environment. Agriculture requires the use of plant protection products and pesticides to prevent damage to crops. Vinclozolin (Vz) is a fungicide that has been banned in the European Union since 2007, but it is still in use in other countries (Boyd, 2006). It can be found in groundwater (60–220 parts per billion [ppb]) and surface water (128–390 ppb) (El-Shahat et al., 2003) and has known anti-androgen endocrine activity in vertebrates (van Ravenzwaay et al., 2013). Furthermore, it can alter the epigenome (Casati et al., 2015) and produce transgenerational effects (Skinner and Anway, 2007). However, the effects in invertebrates remain under investigation, although some data is available. Vz did not affect *Daphnia magna* survival and reproduction, although development was altered (Haeba et al., 2008; Vandegehuchte et al., 2010). Additionally, effects on isopod development and reproduction (Lemos et al., 2010a, 2010b) and mollusk reproduction (Tillmann et al., 2001) have been observed. Lower fecundity in *Lymnaea stagnalis* (Ducrot et al., 2010) and a reduced hatchability in *Physella acuta*, also known as *Physa acuta* (Sánchez-Argüello et al., 2012),

were detected in the presence of Vz. Studies at the cellular level have demonstrated altered DNA methylation in *Aedes albopictus* and *D. magna* (Oppold et al., 2015; Vandegehuchte et al., 2010). Our team recently showed modifications in mRNA levels of genes related to the endocrine system and stress response in the dipteran *Chironomus riparius* (Aquilino et al., 2016). Finally, genotoxicity was shown in *P. acuta* (Sánchez-Argüello et al., 2012) and *C. riparius* (Aquilino et al., 2018), with activation of DNA repair mechanisms associated with the latter species. The fact that invertebrates present a more diverse physiology than vertebrates demanded to extend the research to different groups at the cellular and molecular level. This investigation would help elucidate how Vz modifies cellular metabolism and affects physiology, and, consequently, the whole organism.

The freshwater snail *P. acuta* (Draparnaud, 1805) has been introduced in more than 70 countries worldwide and can survive in aquatic habitats with extreme conditions such as microbial stress and marked pollution (Albrecht et al., 2009). Its extensive distribution, easy culture, and response to toxicants suggest that this species could be a good model organism for aquatic toxicity testing. Therefore, we selected this species to analyze the impact of Vz on the mRNA levels of

* Correspondence to: Facultad de Ciencias, UNED, Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain.

E-mail address: maquilino@ccia.uned.es (M. Aquilino).<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.015>Received 1 June 2018; Received in revised form 6 November 2018; Accepted 6 December 2018
1047-6513/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

***Manuscript**

[Click here to download Manuscript: Manuscript.docx](#)

[Click here to view linked References](#)

1 **Effects on tadpole snail gene expression after exposure to Vinclozolin.**

2 **Mónica Aquilino¹, Paloma Sánchez-Argüello², Marta Novo¹, José-Luis Martínez-**
3 **Guitarte¹.**

4 ¹ Grupo de Biología y Toxicología Ambiental. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional
5 de Educación a Distancia, UNED. Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain.

6 ² Laboratorio de Ecotoxicología, Departamento de Medio Ambiente, Instituto Nacional de
7 Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Crta A Coruña Km 7, 28040
8 Madrid, Spain.

9 *Corresponding author: Mónica Aquilino Amez. Facultad de Ciencias. UNED. Senda del
10 Rey 9. 28040 Madrid. Spain. Telephone: +34913987137.

11 E-mail: maquilino@ccia.uned.es

12 **Keywords:** Vinclozolin, *Physella acuta*, *de novo* transcriptome, biomarkers, detoxification
13 mechanisms, endocrine related genes.

14

15

16 **Abstract**

17 The fungicide vinclozolin (Vz) is an endocrine disruptor with known anti-androgenic activity in
18 vertebrates. However, there is a lack of information about the Vz mode of action in invertebrates,
19 although some studies have shown that this compound can produce alterations in different species.
20 Transcriptional activity was analyzed in the freshwater snail *Physella acuta* in order to elucidate
21 putative cellular processes altered by this chemical during an acute response. In order to identify
22 potential molecular biomarkers, a *de novo* transcriptome was generated for this species that
23 constitutes a valuable source for future studies. This data, together with some already available
24 data, permitted the identification of several genes related to detoxification mechanisms (*Cyp2u1*,
25 *Cyp3a7*, *Cyp4f22*, *GSTo1*, *GSTt2*, and *MRP1*), stress response (*Hsp20.4*, *Hsp17*, *Hsp16.6*, and
26 *Cu,Zn-SOD*), the hormonal system (*ER* and *Hsp90*), apoptosis (*Casp3*), and copper homeostasis
27 (*ATOX1*). Using quantitative Real-Time polymerase chain reaction, mRNA levels of these genes
28 were examined in snails exposed to 20 or 200 µg/L Vz for 24 h. The results showed an overall weak
29 response, with downregulation of *Hsp20.4* and no statistically significant change for the other
30 genes. These findings suggest that *P. acuta* can manage the concentrations of Vz found in the
31 environment with no relevant acute response, although additional studies are needed for longer
32 exposure times. The new genes described open the range of processes that can be studied at the
33 molecular level in toxicity tests. Furthermore, they increase the possibility of better understanding
34 the Vz mode of action.

35

36 1. Introduction

37 Currently, most human activities involve the dispersion of toxicants into the environment. Agriculture
38 requires the use of plant protection products and pesticides to prevent damage to crops. Vinclozolin
39 (Vz) is a fungicide that has been banned in the European Union since 2007, but it is still in use in
40 other countries. It can be found in groundwater (60-220 parts per billion [ppb]) and surface water
41 (128-390 ppb) (El-Shahat et al., 2003) and has known anti-androgen endocrine activity in
42 vertebrates (van Ravenzwaay et al., 2013). Furthermore, it can alter the epigenome (Casati et al.,
43 2015) and produce transgenerational effects (Skinner and Anway, 2007). However, the effects in
44 invertebrates remain under investigation, although some data is available. Vz did not affect *Daphnia*
45 *magna* survival and reproduction, although development was altered (Haeba et al., 2008;
46 Vandegehuchte et al., 2010). Additionally, effects on isopod development and reproduction (Lemos
47 et al., 2010a, 2010b) and mollusk reproduction (Tillmann et al., 2001) have been observed. Lower
48 fecundity in *Lymnaea stagnalis* (Ducrot et al., 2010) and a reduced hatchability in *Physella acuta*,
49 also known as *Physa acuta* (Sánchez-Argüello et al., 2012), were detected in the presence of Vz.
50 Studies at the cellular level have demonstrated altered DNA methylation in *Aedes albopictus* and *D.*
51 *magna* (Oppold et al., 2015; Vandegehuchte et al., 2010). Our team recently showed modifications
52 in mRNA levels of genes related to the endocrine system and stress response in the dipteran
53 *Chironomus riparius* (Aquilino et al., 2016). Finally, genotoxicity was shown in *P. acuta* (Sánchez-
54 Argüello et al., 2012) and *C. riparius* (Aquilino et al., 2018), with activation of DNA repair
55 mechanisms associated with the latter species. The fact that invertebrates present a more diverse
56 physiology than vertebrates demands the need for more research in different groups at the cellular
57 and molecular level. This investigation would help elucidate how Vz modifies cellular metabolism
58 and affects physiology, and, consequently, the whole organism.

59 The freshwater snail *P. acuta* (Draparnaud, 1805) has been introduced in more than 70 countries
60 worldwide and can survive in aquatic habitats with extreme conditions such as microbial stress and
61 marked pollution. Its extensive distribution, easy culture, and response to toxicants suggest that this
62 species could be a good model organism for aquatic toxicity testing. Therefore, we selected this
63 species to analyze the impact of Vz on the mRNA levels of different mollusk genes. Gene
64 expression profiles in mollusks, mainly in marine species, have been used previously to analyze
65 different pollution and stress conditions (Bouétard et al., 2012; Lockwood et al., 2015; Raftos et al.,
66 2016). In this sense, the introduction of Next-Generation Sequencing (NGS) technology has opened
67 a new world of possibilities, such as the identification of biomarker genes among others. Following
68 this idea, we assembled a *de novo* transcriptome that was used together with already available
69 information to identify a number of genes related to important processes involved in the cellular
70 response to toxicants. Since Vz has been identified as an endocrine disruptor in several species, we
71 analyzed expression of the estrogen receptor (*ER*) and heat shock protein 90 (*Hsp90*) genes.

72 These two genes are involved in endocrine regulation, with ER present in multiple mollusk species.
73 ER functionality remains unclear (Hultin et al., 2016), although its ability to bind the vitellogenin
74 promoter was recently described (Tran et al., 2017). Hsp90 functions in cellular stabilization,
75 regulation, and activation of a range of proteins that cover a broad spectrum of protein classes and
76 structural types, including steroid hormone receptors (Erlejman et al., 2014; Pearl, 2016).

77 Response to toxicants also involves different elements that include, among others, the stress
78 response and detoxification mechanisms. Here we have selected several genes related to the
79 stress response, including three that code for small heat shock proteins (sHSPs; *Hsp16.6*, *Hsp17*,
80 and *Hsp20*), copper-zinc superoxide dismutase (*Cu,Zn-SOD*), and antioxidant 1 (*ATOX1*), a copper
81 metallochaperone. sHSPs are chaperones involved in maintenance of cellular homeostasis and are
82 characterized by the presence of an alpha crystalline domain (Bakthisaran et al., 2015). They
83 prevent protein aggregation during stress. SOD is an enzyme that participates in oxidative stress. It
84 limits reactive oxygen species in both the cytosol and mitochondrial intermembrane space by
85 dismuting superoxide anions to hydrogen peroxide and oxygen. Its enzymatic activity is used as a
86 biomarker of oxidative stress (Valavanidis et al., 2006). ATOX1 plays a role in copper homeostasis
87 (Southon et al., 2004), and its mRNA level increases in response to metal pollution (Neave et al.,
88 2012). Detoxification is carried out in three phases. Phase I involves enzymes such as cytochrome
89 P450 oxidases (Cyp450s) that introduce reactive or polar groups into the compound to decrease
90 toxicity (Schuetz, 2001). In Phase II, the compounds are conjugated with polar molecules, such as
91 glutathione or glucuronic acid, to increase solubility and thus ease their elimination. This step
92 involves transferase enzymes such as glutathione S-transferases (GSTs) (Jancova et al., 2010).
93 Phase III involves efflux transporters, like ATPase binding cassette (ABC) transporters (Dermauw
94 and Van Leeuwen, 2014), that pump the modified compounds out of cells. Thus, to study the effect
95 of Vz on detoxification mechanisms, we analyzed three different Cyp450s (*Cyp2u1*, *Cyp3a7*, and
96 *Cyp4f22*), two GST genes (*GSTo1* and *GSTi2*), and one ABC transporter (*MRP1*). Finally, a
97 caspase 3-like protein gene (*Casp3*) was included in the analysis. Caspase 3 is an executioner
98 caspase that can cleave different proteins during apoptosis and other remodeling events (Julien and
99 Wells, 2017).

100 Giving the limited molecular information about *P. acuta* and the effects that Vz has on invertebrates,
101 the aims of this work were: firstly, to improve our knowledge about the cellular response to this
102 compound; secondly, to generate a valuable resource for future studies in this species. To achieve
103 these aims, we generated a *de novo* transcriptome and new biomarkers. Fourteen genes related to
104 hormonal response, detoxification mechanisms, and stress response were identified. By analyzing
105 their transcription, we evaluated the ability of *P. acuta* to manage the effects of Vz.

106 **2. Material and methods**

107 *2.1. Animals and treatment*

108 *P. acuta* were maintained in a climate-controlled room (20°C) for several generations prior to
109 experiments. The culture conditions were defined previously (Sánchez-Argüello et al., 2009).

110 For survival analysis, snails were exposed to 20, 200, 500, or 5,000 µg/L of Vz (CAS No. A 50471-
111 44-8, purity ≥ 99%) from Sigma-Aldrich (Germany). Vz stock solution was prepared in acetone. Ten
112 animals for each condition were exposed for 96 h in 50 mL culture medium without sediment in
113 glass vessels. Control snails were exposed to the same solvent concentration of acetone (0.1%).
114 Three independent experiments were carried out, so n=30 snails per treatment. For expression
115 analyses, *P. acuta* adults were exposed to 20 or 200 µg/L of Vz for 24 h with constant aeration at
116 20°C. Three different experiments were carried out, each with n=3 individuals per glass vessel, with
117 50 mL culture medium without sediment.

118 Samples used for generation of the transcriptome were derived from different life stages and a
119 range of xenobiotic exposures of snails. Egg masses, juveniles, and adults were exposed
120 separately for 24 h to three different contaminants: cadmium (1 µM), bisphenol A (BPA, 10 µg/L),
121 and triclosan (TCS, 10 µg/L), as well as control conditions.

122 *2.2. Generation of the de novo transcriptome*

123 RNA was extracted after pooling individuals from control, Cd, BPA, or TCS treatments: one for a
124 mixture of egg masses, one for a mixture of juveniles, and two for a mixture of adults. First, snails
125 were frozen and homogenized in 1 ml Trizol reagent (Invitrogen, Germany) and then centrifuged at
126 10,000 rpm for 10 min (4°C). The supernatant was transferred to a new tube, 200 µl chloroform was
127 added, and the mixture was incubated for 3 min (room temperature [RT]). The sample was
128 subsequently centrifuged at 10,000 rpm for 15 min (4°C). The resultant upper phase was mixed with
129 500 µl of isopropanol and incubated for 10 min (RT), after which it was centrifuged at 10,000 rpm for
130 10 min (4°C). The supernatant was discarded, 1 mL of 75% ethanol was added, and the sample
131 was centrifuged at 10,000 rpm for 5 min (4°C). After discarding the supernatant, 89 µl of diethyl
132 pyrocarbonate (DEPC) water was added. The RNA extract was treated with RNase-free DNase
133 (Roche, Spain) for 45 minutes at 37°C. Next, a phenol:chlorophorm:isoamyl alcohol (Fluka,
134 Germany) extraction using Phase Lock Light tubes (5prime, USA) was performed. Finally, RNA was
135 precipitated using isopropyl alcohol (0.5 v/v), then washed with 75% ethanol and re-suspended in
136 30 µl DEPC water.

137 RNA integrity was verified using a Bioanalyzer. A mixture of the four RNA extractions was sent to
138 BaseClear (www.baseclear.com), where mRNA was purified by polyA capture and cDNA library
139 construction was performed with the Illumina Tru-Seq stranded kit. The library was sequenced on

140 an Illumina Hi-Seq 2500 using a 125 cycle paired ended protocol. FASTQ sequence files were
141 generated using the Illumina Casava pipeline (version 1.8.3). Initial quality assessment was based
142 on data passing Illumina Chastity filtering. Subsequently, reads containing adapters and/or PhiX
143 control signal were removed using a BaseClear filtering protocol. The second quality assessment
144 was based on the remaining reads using the FASTQC quality control tool version 0.10.0
145 (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>). Average Phred values were 36.38. All reads
146 generated for this study were deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) within study
147 PRJEB23140.

148 The *de novo* transcriptome was assembled using Trinity version r2014-04-13 (Haas et al., 2013)
149 under default settings. The resultant contigs were annotated by blastX analysis against Uniprot
150 database (only Metazoa) using an e-value threshold of 1e-5.

151 2.3. Sequence identification and primer design

152 Two sets of sequences were used in this work: our transcriptome and sequences published by
153 Romiguier et al. (2014). First, we blasted all the sequences with GenBank (see 2.2 for transcriptome
154 details). The sequences published by Romiguier et al. (2014) are available on the web
155 (http://kimura.univ-montp2.fr/PopPhyl/index.php?section=data#dataset_0), so we used them to run
156 a systematic search in GenBank database with Blast2go software (Conesa et al., 2005). The search
157 was performed with the tblastx program, a non-redundant database, and an e-value threshold of 1e-
158 3. The obtained information was processed to select a number of candidate genes. The selected
159 sequences were translated with Snappgene software (GSL Biotech LLC, USA), and the protein was
160 compared to the GenBank protein database to re-confirm correspondence to the selected gene.
161 The sequences for *Cyp3a7*, *Hsp16.6*, *MRP1*, *ATOX1*, *Cyp4f22*, *Hsp17*, *Gsto1*, *Hsp20.4*, *Cyp2u1*,
162 *GAPDH*, *rpL10*, and *Gstt2* were identified in our transcriptome, while *Hsp90*, *Cu,Zn-SOD*, and
163 *Casp3* were obtained from Romiguier et al. (2014) sequences. The *ER* sequence was previously
164 identified by Martínez-Paz et al. (2017). Here we confirmed homology with other species. Primers
165 were designed using Primer-Blast (Ye et al., 2012) with an amplicon size of 100-200 base pairs (bp)
166 and an optimal melting temperature of 58°C. Each primer pair was tested by polymerase chain
167 reaction (PCR) in a C1000 thermocycler (BioRad, USA) with DNA AmpliTools Green Master Mix
168 (Biotools, Spain) to confirm, using a 1.5% agarose gel, that a unique band was generated. PCR was
169 performed with the same program that was used for quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).

170 2.4. cDNA synthesis and real time (RT-PCR).

171 RNA extraction was performed using the method described in 2.2. Reverse transcription was
172 performed with 0.5 µg of the isolated RNA, 0.5 µg oligonucleotide dT20 primer (Sigma, Germany),
173 100 units of M-MLV enzyme (Invitrogen, Germany), and 0.5 mM dNTPs (Biotools, Spain) at 37°C

174 for 50 min in a final reaction volume of 20 μ L. The obtained cDNA was used as the template for
 175 qRT-PCR with a CFX96 thermocycler (BioRad, USA) using the Quantimix Easy Probes kit (Biotools,
 176 Spain) with EvaGreen (Biotium, USA) added as the fluorophore. PCR cycling conditions were: initial
 177 denaturation at 95°C for 30 s followed by 39 cycles of 95°C for 5 s, 58°C for 15 s, and 65 °C for 10
 178 s. PCR efficiency was obtained with a standard curve using template diluted 1:2 in five successive
 179 steps with the same PCR conditions ($R^2 > 0.98$ for all primers). The primer sequences and their
 180 efficiencies are listed in Table 1. Expression profiles for *Cyp2u1*, *Cyp3a7*, *Cyp4f22*, *GSTo1*, *GSTt2*,
 181 *MRP1*, *Hsp16.6*, *Hsp17*, *Hsp20.4*, *Cu,Zn-SOD*, *ER*, *Hsp90*, *Casp3*, and *ATOX1* after Vz exposure
 182 were evaluated. Reference genes for normalization were *glyceraldehyde 3-*
 183 *phosphatedehydrogenase (GAPDH)* and *ribosomal protein L10 (rpl10)*. BioRad CFX Manager
 184 version 3.1 software was used to determine mRNA levels by normalizing the gene expression ($2^{-\Delta Cq}$).
 185

Table 1. Primers sequences and their efficiency in qRT-PCR.

Biological process	Name	Sequence	Efficiency (E%)
Detoxification	CYP2U1 F	GTGCATCCTCTACGCGATCA	94.7
	CYP2U1 R	GGCTAGTTTGGGCTGTCTT	
	CYP3A7 F	ACGGCTTGGCCTCTCAATAC	90.0
	CYP3A7 R	CGGTTTCTTCTCGGCGTTC	
	CYP4F22 F	AGCAGAAAAAGCTCAGCCCT	98.7
	CYP4F22 R	CTTGGTTTGGCAGCCAGTC	
	GSTt2 F	TCGATCTTCTATCGCAGCCG	90.7
	GSTt2 R	TTCTGAGCGCAACAGGTTTG	
	GSTo1 F	CCACCTGGCAACTTGGTTTG	94.0
	GSTo1 R	GCTTGCCAGATGCGTAAGAC	
	MRP 1 F	CAGGGGCAGGTAAGTCATCC	100.0
	MRP 1 R	AGTGAGCCTTGATCGCACAT	
Stress	Hsp16.6 F	GCATGAGGAGAAGCAAGACA	88.1
	Hsp16.6 R	CAGTACACCATGGGCATTCA	
	Hsp17 F	GGGATCTAAGACCCCGATG	101.0
	Hsp17 R	GGCTGTAATGGCGAAGCTCC	
	Hsp20.4 F	AGCGAGATGTTCCACCTCAA	94.0
	Hsp20.4 R	GAGAGACAGCCGTTTGTTC	

	Cu,Zn-SOD F	AGAAAGCTGGTGCTGCAACTA	
	Cu,Zn-SOD R	AGGATTAAGTGGCCTCCAGC	104.9
Endocrine system	ER F	CTATGCCAGGTGTGAATGAC	
	ER R	CGAAGCCGACATGCTTGACA	102.3
	Hsp90 F	GTTTGTGCTACTAAAGAAGGCC	
	Hsp90 R	TGTCACTAGCCTATTTGATACAACC	100.4
Apoptosis	Cas3 F	GTCTGTAATTCTCACCCATG	
	Cas3 R	AGTTCAGTGCCTCTGCAAGC	99.2
Heavy metals	ATOX F	GACCTGTGAAGGGTGTGCG	
	ATOX R	ATTCCAGGAGCTGATCAGGG	102.3
Reference genes	GAPDH F	ATACATCAGGAACAGGGACTC	
	GAPDH R	GACTTATGACAACCGTGCA	94.9
	rpL10 F	TGCACGTGAGGCTGATGAAA	
	rpL10 R	GTGGCCACTTTGTGAAACCC	104.2

186 2.5. Statistical analysis

187 Statistical analyses were performed using SPSS version 24 (IBM); n=9 for each condition.
 188 Logarithmic data transformation was performed, and normality and variance homogeneity of the
 189 data were assessed using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. All genes showed a
 190 normal distribution and were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using Dunnet and Games-
 191 Howell post-hoc tests. The significance level was $p \leq 0.05$.

192 3. Results.

193 3.1. Effects of Vz on *P. acuta* survival

194 We evaluated the lethality of Vz on *P. actua*. No mortality was observed at any of the concentrations
 195 tested (Supplementary Material). Thus, Vz was not lethal at the time and concentrations tested, and
 196 so these concentrations were suitable to perform short-term expression studies. These results were
 197 in accordance with previous results found in other invertebrates (Aquilino et al., 2016).

198 3.2. De novo transcriptome and annotation

199 The number of reads used for transcriptome assembly after quality trimming was 16,761,166. The
 200 Trinity assembly yielded a N50 of 1,316 and 20,953 contigs were longer than 1000 bps. The

201 number of contigs that yielded a significant blast match was 39,117 (from a total number of 93,851),
202 although the number of non-redundant hits was 23,708.

203 3.3 Gene analysis

204 We identified sixteen target genes, including two genes that were used as references genes for
205 qRT-PCR. The accession number, sequence size, open reading frame (ORF) size, and homology
206 are summarized in Table 2. Most of the sequences were not previously described and thus
207 increased the number of putative biomarkers and the number of pathways that may be studied in
208 this species. Only the *ER* sequence had been previously reported (Martínez-Paz et al., 2017). It
209 showed high homology with the estrogen receptor from *Aplysia californica*. The proteins coded by
210 each sequence, and the different motifs identified in each protein, are shown in Figure 1. Six
211 detoxification related sequences were identified. Three of them coded for members of the Cyp450
212 superfamily of proteins: Cyp2, Cyp3, and Cyp4. These proteins showed similar identity to proteins of
213 these families from the air-breathing freshwater snail *Biomphalaria glabatra*. While Cyp2u1 exhibited
214 less than 60% sequence identity, the other two proteins showed greater than 60% identity. All of the
215 proteins contained the characteristic Cyp450 domain. Two sequences were homologous to GST;
216 one belonged to the omega family and the other belonged to the theta family. Both proteins showed
217 more than 70% identity with GSTs from *Biomphalaria glabatra*. The last sequence that coded for a
218 protein related to detoxification was an ABC transporter. It coded for a 1,628 amino acid (aa) ORF
219 and shared approximately 50% identity to MRP1 of a scallop species (*Mizuhopecten yessoensis*).

220 Another group of identified sequences were related to the stress response. One protein was 1,570
221 bp in length, although it had a small ORF (73 aa). The protein contained a heavy-metal-associated
222 domain and homology with *ATOX1* from the Suminoe oyster, *Crassostrea ariakensis*, so we
223 identified this sequence as copper chaperone *ATOX1*. The three other sequences coded for sHSPs
224 since they presented ORFs with the characteristic alpha-crystallin domain. The proteins coded were
225 named based on molecular weight because this protein family varies considerably between species
226 at both the sequence level and the number of proteins. The proteins termed Hsp16.6 and Hsp17
227 shared 63% and 86%, respectively, identity with Hsp12.2 of *Biomphalaria glabatra*. Hsp20.4 shared
228 only about 50% identity with Hsp20 from the venus clam *Cyclina sinensis*.

229 Sequences for *Casp3*, *Cu,Zn-SOD*, and *Hsp90* were obtained from Romiguier et al. (2014). Their
230 lengths were 2,275, 793, and 2,510 bp, respectively. The ORFs were 298, 155, and 728 aa,
231 respectively, and the three putative proteins presented the characteristic domains for these proteins:
232 caspase domain, copper/zinc SOD domain, and Hsp83 domain. Identity with other mollusks was
233 high for *Cu,Zn-SOD* and *Hsp90* (greater than 80%) but weaker for *Casp3* (about 60%).

234 The sequences for two reference genes were also identified. *GAPDH* was 1,711 bp in length and
 235 coded for a 337 aa protein. The protein presented the characteristic domains of this enzyme: a
 236 NAD-binding domain and a C-terminal domain. It showed high identity with GAPDH from *A.*
 237 *californica*. *rpL10* was a 778 bp sequence with an ORF of 216 aa. The presence of the rpL10
 238 domain and its homology with rpL10 of *Haliotis discus* confirmed the identity.

Table 2. Sequence characteristics and protein homology. Accession number in GenBank is provided for sequences from the generated transcriptome, while ID assigned by Romiguier et al. (2014) is provided for the rest.

Accession Number or ID	Fragment size (bp)	Gene	Protein size (aa)	Closest homology	Identity/Homology
MG262478	1667	<i>Cyp2u1</i>	497	PREDICTED: cytochrome P450 2U1-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] XP_013065833	48%/67%
MG262486	2919	<i>Cyp3a7</i>	493	PREDICTED: cytochrome P450 3A7-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] XP_013065103	62%/78%
MG262482	1761	<i>Cyp4f22</i>	508	PREDICTED: cytochrome P450 4F22-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] XP_013084664	73%/87%
MG262480	1130	<i>GSTo1</i>	240	PREDICTED: glutathione S-transferase omega-1-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] XP_013062909	71%/83%
MG253803	1353	<i>GSTi2</i>	230	PREDICTED: glutathione S-transferase theta-2-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] XP_013081705	77%/90%
MG262484	5155	<i>MRP1</i>	1628	Multidrug resistance-associated protein 1-like [<i>Mizuhopecten yessoensis</i>] XP_021341468	51%/70%
MG262485	1068	<i>Hsp16.6</i>	144	PREDICTED: heat shock protein Hsp-12.2-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] XP_013069954	63%/79%
MG262481	1742	<i>Hsp17</i>	159	PREDICTED: heat shock protein Hsp-12.2-like [<i>Biomphalaria glabrata</i>] XP_013090183	86%/95%
MG262479	1185	<i>Hsp20.4</i>	173	Heat shock protein 20 [<i>Cyclina sinensis</i>] AET13647	55%/75%
Contig13629	793	<i>Cu,Zn-SOD</i>	155	Cu/Zn superoxide dismutase [<i>Lymnaea stagnalis</i>]	84%/92%

AAP93637					
Contig3836 (described in Martinez-Paz et al., 2017)	2028	<i>ER</i>	469	Estrogen receptor [<i>Aplysia californica</i>] NP_001191648	83%/89%
Contig22373	2510	<i>Hsp90</i>	728	Heat shock protein 90 [<i>Cellana toreuma</i>] AGH32328	84%/92%
Contig1523	2275	<i>Casp3</i>	298	PREDICTED: caspase-3-like [<i>Aplysia californica</i>] XP_005099863	63%/79%
MG262483	1570	<i>ATOX1</i>	73	Copper chaperone Atox1 [<i>Crassostrea ariakensis</i>] AEJ08756	69%/82%
MG262477	1711	<i>GAPDH</i>	337	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like [<i>Aplysia californica</i>] NP_001267755	81%/91%
MG262476	778	<i>rpL10</i>	216	Ribosomal protein l10 [<i>Haliotis discus discus</i>] ABO26700	87%/93%

239 3.3. Effects of Vz on detoxification mechanisms

240 One of the most important events in the response to toxicants is the activation of detoxification
241 mechanisms. We performed expression analysis using genes that cover the three phases of
242 detoxification: phase I (three Cyp450s that belong to different families), phase II (two different
243 classes of GSTs), and phase III (*MRP1*). There was no statistically significant difference in
244 expression of these genes between animals exposed to Vz for 24 h and control treatment (Figure
245 2). Altogether, these results indicate that phase I, phase II, and phase III detoxification may not be
246 activated at these Vz concentrations, although we observed a trend for increased *Cyp4f22* and
247 *GSTt2* expression at 20 µg/L Vz.

248 3.4. Stress response to Vz

249 Another important cellular process involved in survival from toxicants is the stress response. HSPs
250 are the main stress proteins, and sHSPs are the most diverse group in this family. To study the
251 stress response to Vz we chose three sHSP genes: *Hsp16.6*, *Hsp17*, and *Hsp20.4* (Figure 3).
252 Compared to control, we observed significant downregulation of *Hsp20.4* at 20 µg/L Vz, but no
253 significant difference for *Hsp16.6* and *Hsp17* (although there was a trend for *Hsp16.6*
254 downregulation). Oxidative stress implies the activation of different enzymes. To test the ability of Vz
255 to activate the response to oxidative stress in this organism, we analyzed *Cu,Zn-SOD* gene

256 expression (Figure 3). Vz did not induce altered *Cu,Zn-SOD* expression at any concentration. In
257 summary, the stress response is only weakly activated in *P. acuta* after acute exposure to Vz.

258 3.5. Vz effects on endocrine-related and other genes

259 Vz is a known anti-androgen and disrupts endocrine functions in vertebrates. To analyze its effects
260 on the *P. acuta* endocrine system, we examined *ER* and *Hsp90*. *ER* was selected as representative
261 of the nuclear receptors involved in endocrine response, although the synthesis of estrogen by
262 mollusks is still under study. *Hsp90* was selected because it is involved in the maturation of different
263 steroid receptors. Compared to control, Vz-exposed adults showed no alterations in mRNA from
264 either gene (Figure 4). We further examined two additional genes: *Casp3* (involved in apoptosis and
265 other cell processes) and *ATOX1* (plays a role in response to heavy metals and copper
266 homeostasis). Vz treatment did not induce a change for either gene (Figure 5). Taken together, Vz
267 did not alter expression of these four genes under our experimental conditions.

268 4. Discussion

269 In vertebrates, Vz disrupts endocrine functions and has an anti-androgen effect (van Ravenzwaay
270 et al., 2013). Indeed, it is used as a reference compound for anti-androgenic effects. The available
271 studies for vertebrates are mainly focused on the epigenetic and transgenerational effects of Vz
272 (Casati et al., 2015; Paoloni-Giacobino, 2014). However, in invertebrates, Vz toxicity is usually
273 analyzed using apical or ecologically relevant endpoints, and little data are available on how Vz
274 affects cellular metabolism. Nevertheless, the endocrine disruptor activity of this compound has
275 been described in mollusks (Tillmann et al., 2001). In this study we analyzed the expression profile
276 of fourteen genes from the freshwater snail *P. acuta*, all of which (except *ER*) were described for the
277 first time in this species, in an attempt to elucidate the response mechanisms affected by this
278 compound. The description of new genes, including reference genes, is relevant because
279 information of this nature at the molecular level in invertebrates remains scarce and is necessary to
280 increase the range of putative molecular biomarkers. Further, the availability of this kind of resource
281 will help the study of gastropod physiology and improve the knowledge of how a toxicant works.

282 With NGS, we obtained a transcriptome that covered a large number of transcripts. However, NGS
283 is still too expensive to perform environmental toxicology studies because a large number of
284 samples are needed to generate robust conclusions. Currently, qRT-PCR offers an affordable
285 alternative to obtain gene expression profiles. From the transcriptome and database, we identified
286 genes related to detoxification mechanisms (*Cyp2u1*, *Cyp3a7*, *Cyp4f22*, *GSTo1*, *GSTt2*, and
287 *MRP1*), the stress response (*Hsp16.6*, *Hsp17*, *Hsp20.4*, and *Cu,Zn-SOD*), the hormonal system
288 (*Hsp90*), apoptosis (*Casp3*), and heavy metal resistance (*ATOX1*); these genes are all related to
289 cellular processes relevant to toxicant response. We also described two reference genes, *GAPDH*

290 and *rpL10*. Most of the identified genes were previously reported in other gastropod species, but
291 this study is the first time that *MRP1*, *Hsp20.4*, and *ATOX1* were described for this class. Increasing
292 the pool of genes related to processes involved in the toxicant response helps to analyze how an
293 organism manages a chemical and allows us to evaluate its ability to survive and thrive in this
294 environment.

295 Here we have described three Cyp450s, each from a different family, and two GSTs, also from
296 different families. It is common to all cells to activate biotransformation when an external compound
297 is detected. Different enzymes are activated to reduce its toxicity and increase its solubility in order
298 to facilitate elimination from the cell. Many enzymes involved in phase I are Cyp450s, and so they
299 may play a central role in an animal's adaptation to environmental pollutants. In vertebrates,
300 analysis of this process has been poorly studied in relation to Vz, but this chemical shows a
301 complex pattern of induction, inhibition, and suppression of Cyp450s (Hrelia et al., 1996; Ronis et al.,
302 1994, 1998). For invertebrates, only a report from our laboratory with the insect *C. riparius* exists
303 in relation to this compound (Aquilino et al., 2016); it showed that Cyp4G was upregulated. In this
304 study, Vz did not significantly alter the three Cyp450s tested, although *Cyp4f22* showed a trend for
305 upregulation compared to control. This finding suggests a putative involvement of the Cyp4 family in
306 the biotransformation of Vz in *P. acuta*, but further research is needed. This involvement is not
307 necessarily peculiar, since the Cyp4 family is usually considered to be involved in insecticide
308 resistance (Feyereisen, 2006). On the other hand, there is no report about *Cyp2u1* in relation to
309 toxicants, although it has been identified as an enzyme that catalyzes omega- and (omega-1)-
310 hydroxylation of fatty acids in humans and it is related to disease (Chuang et al., 2004; Dhers et al.,
311 2017). *Cyp3a7*, is reportedly involved in biotransformation and development in humans and other
312 mammals (Buratti et al., 2006; Pang et al., 2012), but there is no information about invertebrates.
313 However, the Cyp3A family has been associated with responses to xenobiotics in mollusks (Cubero-
314 Leon et al., 2012; Tian et al., 2014), albeit at longer exposures. In summary, additional research that
315 extends the analysis to other Cyp450s is needed to determine which ones are involved in Vz
316 biotransformation, since it has been suggested that Cyp2 and Cyp3 could be involved (Sierra-
317 Santoyo et al., 2012).

318 GSTs are phase II enzymes that add glutathione to the compound modified in phase I. GSTs are
319 usually analyzed by enzymatic activity assay which makes it impossible to differentiate which
320 member or members are responsible for the activity. It was reported that Vz activated GSTs in rat
321 liver (Hoshiya et al., 1993), and we previously showed that *Gstd3* mRNA levels were increased by
322 Vz in *C. riparius* (Aquilino et al., 2016). Our results in *P. acuta* showed no statistically significant
323 difference for the two GSTs analyzed. However, *GSTt2* exhibited a similar upregulation trend as
324 observed for *Cyp4f22*, and this result suggests a putative induction of both genes in relation to Vz
325 biotransformation. Additional research with longer exposure times would potentially clarify this

326 possibility. MRP1 is an ATP binding cassette transporter implicated in removing different chemicals
327 from the cell. It has not been analyzed in relation to Vz, but it is induced by cadmium,
328 benzo[a]pyrene, and chrysene (Granger Joly de Boissel et al., 2017; Guo et al., 2017) in mollusks.
329 Our results did not reveal any change in their transcription, and this finding suggests that another
330 ABC transporter is probably involved in Vz elimination (at least with the conditions tested). It cannot
331 be discounted that the low concentrations used, namely 20 and 200 µg/L, are below the threshold
332 required to activate detoxification mechanisms, and longer exposures may be required to reveal any
333 variations.

334 Stress response is another cellular process usually activated by toxicants. HSPs are involved in this
335 response and considered to be putative biomarkers (Bierkens, 2000). Studies usually focus on
336 *Hsp70*, but here we analyzed three sHSPs, a more diverse group of proteins that, taken as a set,
337 can show a specific response depending on the toxicant (Martín-Folgar et al., 2018; Martín-Folgar
338 and Martínez-Guitarte, 2017). Surprisingly, as far as we know, no studies have been performed in
339 vertebrates exposed to Vz with regard to HSPs, and only two studies have been carried out in
340 invertebrates analyzing *Hsp70* (Aquilino et al., 2016; Lemos et al., 2010b); both reports showed
341 *Hsp70* upregulation. We identified three genes that code sHSP group members and have named
342 them *Hsp16.6*, *Hsp17*, and *Hsp20.4* based on molecular weight (as is standard in invertebrates).
343 Identification of these proteins was easy because they had the characteristic sHSP alpha crystalline
344 domain. Further, their involvement in other processes such as development or apoptosis regulation
345 (Arrigo et al., 2002; Gu et al., 2012) make them an interesting link between cellular responses and
346 physiological effects of toxicants. We observed that only *Hsp20.4* was downregulated by Vz, while
347 the other two proteins remain stable. The only precedent for altered sHSP expression is *Hsp24*
348 upregulation in *C. riparius* (Aquilino et al., 2016). These results are not in conflict since sHSP
349 diversity makes it difficult to ensure that different sized sHSPs are homologous in different species
350 (Carra et al., 2017; Franck et al., 2004). On the contrary, the observed differential response
351 supports the idea that this group of proteins could serve as hallmarks to associate specific profiles
352 with groups of toxicants.

353 Analysis of oxidative stress induced by Vz has also been neglected. Only two reports exist that
354 examined cultured mammalian cells (Radice et al., 1998) and fish spermatozoa (Gazo et al., 2013).
355 In cultured cells, prolonged *in vitro* Vz treatment increased glutathione levels, which were
356 associated with a relative abundance of *gamma-glutamylcysteine synthetase* mRNA. In fish
357 spermatozoa, oxidative stress was reflected by significantly higher levels of protein and lipid
358 oxidation and increased SOD activity. Unlike what was described in those studies, we did not
359 observe any differences between control and Vz-treated animals for *Cu,Zn-SOD* mRNA. This
360 finding could indicate that *P. acuta* may be more resistant to this compound than vertebrates. It is
361 also possible that SOD activity increased enough to manage the amount of Vz present in the

362 environment, with no concomitant change in *Cu,Zn-SOD* expression. Analysis at longer treatment
363 times could help elucidate why Vz seems ineffective in activating oxidative stress response in *P.*
364 *acuta*.

365 Vz is a known anti-androgen but, to our knowledge, no androgen receptor has been described in
366 mollusks, although there is some controversy about the effects of sex steroids within this group of
367 animals (Scott, 2012, 2013). However, it has been demonstrated that Vz affects the development
368 and reproduction of gastropods (Ducrot et al., 2010; Tillmann et al., 2001), and these studies
369 indicate its impact as an endocrine disruptor. Nevertheless, the putative mechanisms that are
370 involved at the molecular level have not been studied. We analyzed one of the receptors related
371 with steroid hormones, the estrogen receptor, and one protein related to its folding, Hsp90 (Eckl and
372 Richter, 2013). Vz treatment did not alter their mRNA expression under the experimental conditions.
373 Vz may have no effect on *ER* expression, and its inability to activate *ER* in CHO cells (Kojima et al.,
374 2004) supports this possibility. However, it has been proposed that, in some way, Vz can alter the
375 estrogen response by affecting different steroid pathways than those described as anti-androgen
376 (Buckley et al., 2006). To support this, Buckley et al. (2006) indicated that female mice exposed to
377 Vz showed downregulation of ER alpha and upregulation of the progesterone receptor while
378 exposed male mice showed upregulation of both receptors. In accordance with this finding, male
379 rats showed an altered and complex pattern of ER alpha and beta expression after Vz exposure
380 (Loutchanwoot et al., 2008). The poor knowledge of the mollusk endocrine system at the molecular
381 level makes it difficult to elucidate what happens in presence of Vz, so it is necessary to extend the
382 search to other putative targets related to the endocrine system.

383 Although Vz was ranked as essentially nongenotoxic (Kevekordes et al., 1996), it induced
384 micronucleus in *P. acuta* (Sánchez-Argüello et al., 2012). Moreover, Vz produced DNA breaks in *C.*
385 *riparius* and led to activation of DNA repair mechanisms (Aquilino et al., 2018). Here we examined a
386 gene related to apoptosis, *Casp3*, which has been linked to genotoxicity. Vz did not alter *Casp3*
387 mRNA in *P. acuta*, similar to what was observed in *C. riparius* with *Decay*, a caspase 3-like gene
388 (Aquilino et al., 2018). However, higher levels of caspase-3 protein expression and proteolytic
389 activity were found in exposed porcine cultured cells, and this finding suggests that Vz is a
390 proapoptotic factor (Knet et al., 2015). Further, increased apoptosis was observed in Vz-exposed
391 mouse embryo germ cells (Uzumcu et al., 2004). All these observations suggest that Vz
392 differentially affects cells; it induces DNA breaks in some and apoptosis in others. Dose and cell
393 type seem to be important factors with regard to the damage that it can produce. It is possible that
394 DNA damage would be one of the factors that induces apoptosis, and so this possibility should be
395 further investigated.

396 The last gene studied, *ATOX1*, is involved in the heavy metal response and plays an essential role
397 in copper homeostasis. In *Hyalella azteca*, it was reported that hemocyanin expression was altered
398 by Vz (Wu et al., 2014), and this finding raises the possibility that copper homeostasis could be, in
399 some way, indirectly affected by this chemical. Our results showed that there was no alteration in
400 the *ATOX1* expression, and so copper homeostasis seems to be unaffected by Vz under the
401 conditions tested.

402 In summary, thirteen new putative molecular biomarkers that cover different cellular pathways,
403 including detoxification and stress, have been identified in this gastropod, and NGS data has been
404 generated as an available resource for future studies. The acute response of *P. acuta* to Vz is weak
405 at the concentrations tested; only *Hsp20.4* was downregulated, although certain trends for altered
406 expression of other genes were observed. According to the results, 24 h Vz exposure did not
407 activate biotransformation mechanisms or involve other enzymes, and this result supports that *P.*
408 *acuta* can manage certain amounts of the compound without visible damage. This supposition is
409 further supported by the lack of stress response activation, although *Hsp20.4* downregulation
410 suggests some weak effects. Longer exposures will help to elucidate the damage that Vz can exert
411 in this species and the putative effect this can have in the maintenance of the population.

412 **Acknowledgements**

413 This work was supported by the *Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación*
414 *Tecnológica* (Spain), grant CTM2015-64913-R from the *Ciencias y Tecnologías Medioambientales*
415 program. M.A. is the recipient of a predoctoral contract from the Ministry of Economy and Finance
416 (BES-2013-064041). M.N. was supported by a Postdoctoral Fellowship (FPDI-2016-453 16407)
417 from the Spanish Government and a Postdoctoral Fellowship from UNED. The authors declare that
418 there are no conflicts of interest.

419 **References**

- 420 Aquilino, M., Sánchez-Argüello, P., Martínez-Guitarte, J.-L., 2018. Genotoxic effects of vinclozolin
421 on the aquatic insect *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Environ. Pollut.* 232, 563-
422 570. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.088>.
- 423 Aquilino, M., Sánchez-Argüello, P., Martínez-Guitarte, J.-L., 2016. Vinclozolin alters the expression
424 of hormonal and stress genes in the midge *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 174, 179–187.
425 <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.03.001>.
- 426 Arrigo, A.-P., Paul, C., Ducasse, C., Manero, F., Kretz-Remy, C., Viro, S., Javouhey, E., Mounier,
427 N., Diaz-Latoud, C., 2002. Small stress proteins: novel negative modulators of apoptosis induced
428 independently of reactive oxygen species. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 28, 185–204.

- 429 Bakthisaran, R., Tangirala, R., Rao, C.M., 2015. Small heat shock proteins: role in cellular functions
430 and pathology. *Biochim. Biophys. Acta* 1854, 291–319.
431 <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.12.019>.
- 432 Bierkens, J.G., 2000. Applications and pitfalls of stress-proteins in biomonitoring. *Toxicology* 153,
433 61–72.
- 434 Bouétard, A., Noirot, C., Besnard, A.-L., Bouchez, O., Choisine, D., Robe, E., Klopp, C., Lagadic, L.,
435 Coutellec, M.-A., 2012. Pyrosequencing-based transcriptomic resources in the pond snail
436 *Lymnaea stagnalis*, with a focus on genes involved in molecular response to diquat-induced
437 stress. *Ecotoxicol.* 21, 2222–2234. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0977-1>.
- 438 Buckley, J., Willingham, E., Agras, K., Baskin, L.S., 2006. Embryonic exposure to the fungicide
439 vinclozolin causes virilization of females and alteration of progesterone receptor expression in
440 vivo: an experimental study in mice. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* 5, 4.
441 <https://doi.org/10.1186/1476-069X-5-4>.
- 442 Buratti, F.M., Leoni, C., Testai, E., 2006. Foetal and adult human CYP3A isoforms in the
443 bioactivation of organophosphorothionate insecticides. *Toxicol. Lett.* 167, 245–255.
444 <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.10.006>.
- 445 Carra, S., Alberti, S., Arrigo, P.A., Benesch, J.L., Benjamin, I.J., Boelens, W., Bartelt-Kirbach, B.,
446 Brundel, B.J.J.M., Buchner, J., Bukau, B., Carver, J.A., Ecroyd, H., Emanuelsson, C., Finet, S.,
447 Golenhofen, N., Goloubinoff, P., Gusev, N., Haslbeck, M., Hightower, L.E., Kampinga, H.H.,
448 Klevit, R.E., Liberek, K., Mchaourab, H.S., McMenimen, K.A., Poletti, A., Quinlan, R., Strelkov,
449 S.V., Toth, M.E., Vierling, E., Tanguay, R.M., 2017. The growing world of small heat shock
450 proteins: from structure to functions. *Cell Stress Chaperones* 22, 601–611.
451 <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0787-8>.
- 452 Casati, L., Sendra, R., Sibilia, V., Celotti, F., 2015. Endocrine disrupters: the new players able to
453 affect the epigenome. *Front. Cell Dev. Biol.* 3, 37. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00037>.
- 454 Chuang, S.S., Helvig, C., Taimi, M., Ramshaw, H.A., Collop, A.H., Amad, M., White, J.A., Petkovich,
455 M., Jones, G., Korczak, B., 2004. CYP2U1, a novel human thymus- and brain-specific
456 cytochrome P450, catalyzes omega- and (omega-1)-hydroxylation of fatty acids. *J. Biol. Chem.*
457 279, 6305–6314. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311830200>.
- 458 Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Robles, M., 2005. Blast2GO: a
459 universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research.
460 *Bioinformatics* 21, 3674–3676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>.
- 461 Cubero-Leon, E., Puinean, A.M., Labadie, P., Ciocan, C., Itoh, N., Kishida, M., Osada, M., Minier,
462 C., Hill, E.M., Rotchell, J.M., 2012. Two CYP3A-like genes in the marine mussel *Mytilus edulis*:
463 mRNA expression modulation following short-term exposure to endocrine disruptors. *Mar.*
464 *Environ. Res.* 74, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.11.012>.

465 Dermauw, W., Van Leeuwen, T., 2014. The ABC gene family in arthropods: comparative genomics
466 and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45, 89–110.
467 <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.001>.

468 Dhers, L., Ducassou, L., Boucher, J.-L., Mansuy, D., 2017. Cytochrome P450 2U1, a very peculiar
469 member of the human P450s family. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 1859–1869.
470 <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2443-3>.

471 Ducrot, V., Teixeira-Alves, M., Lopes, C., Delignette-Muller, M.-L., Charles, S., Lagadic, L., 2010.
472 Development of partial life-cycle experiments to assess the effects of endocrine disruptors on the
473 freshwater gastropod *Lymnaea stagnalis*: a case-study with vinclozolin. *Ecotoxicol.* 19, 1312–
474 1321. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0518-8>.

475 Eckl, J.M., Richter, K., 2013. Functions of the Hsp90 chaperone system: lifting client proteins to new
476 heights. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 4, 157–165.

477 El-Shahat, M.F., Al-Nawayseh, K.M., Jiries, A.G., Alnasir, F.M., 2003. Pesticides and heavy metal
478 distribution in southern Dead Sea basin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 1230–1238.

479 Erlejman, A.G., Lagadari, M., Toneatto, J., Piwien-Pilipuk, G., Galigniana, M.D., 2014. Regulatory
480 role of the 90-kDa-heat-shock protein (Hsp90) and associated factors on gene expression.
481 *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 71–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.12.006>.

482 Feyereisen, R., 2006. Evolution of insect P450. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1252–1255.
483 <https://doi.org/10.1042/BST0341252>.

484 Franck, E., Madsen, O., van Rheede, T., Ricard, G., Huynen, M.A., de Jong, W.W., 2004.
485 Evolutionary diversity of vertebrate small heat shock proteins. *J. Mol. Evol.* 59, 792–805.
486 <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0013-z>.

487 Gazo, I., Linhartova, P., Shaliutina, A., Hulak, M., 2013. Influence of environmentally relevant
488 concentrations of vinclozolin on quality, DNA integrity, and antioxidant responses of sterlet
489 *Acipenser ruthenus* spermatozoa. *Chem. Biol. Interact.* 203, 377–385.
490 <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.01.004>.

491 Granger Joly de Boissel, P., Fournier, M., Rodriguez-Lecompte, J.C., McKenna, P., Kibenge, F.,
492 Siah, A., 2017. Functional and molecular responses of the blue mussel *Mytilus edulis* hemocytes
493 exposed to cadmium - an in vitro model and transcriptomic approach. *Fish Shellfish Immunol.* 67,
494 575–585. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.001>.

495 Gu, J., Huang, L.-X., Shen, Y., Huang, L.-H., Feng, Q.-L., 2012. Hsp70 and small Hsps are the
496 major heat shock protein members involved in midgut metamorphosis in the common cutworm,
497 *Spodoptera litura*. *Insect Mol. Biol.* 21, 535–543. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2012.01158.x>.

499 Guo, R., Pan, L., Lin, P., Zheng, L., 2017. The detoxification responses, damage effects and
500 bioaccumulation in the scallop *Chlamys farreri* exposed to single and mixtures of benzo[a]pyrene

- 501 and chrysene. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 191, 36–51.
502 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.09.004>.
- 503 Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B.,
504 Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks,
505 N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., Leduc, R.D., Friedman, N., Regev,
506 A., 2013. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for
507 reference generation and analysis. *Nat. Protoc.* 8, 1494–1512.
- 508 Haeba, M.H., Hilscherová, K., Mazurová, E., Bláha, L., 2008. Selected endocrine disrupting
509 compounds (vinclozolin, flutamide, ketoconazole and dicofol): effects on survival, occurrence of
510 males, growth, molting and reproduction of *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 15,
511 222–227.
- 512 Hoshiya, T., Hasegawa, R., Hakoi, K., Cui, L., Ogiso, T., Cabral, R., Ito, N., 1993. Enhancement by
513 non-mutagenic pesticides of GST-P positive hepatic foci development initiated with
514 diethylnitrosamine in the rat. *Cancer Lett.* 72, 59–64.
- 515 Hrelia, P., Fimognari, C., Maffei, F., Vigagni, F., Mesirca, R., Pozzetti, L., Paolini, M., Cantelli Forti,
516 G., 1996. The genetic and non-genetic toxicity of the fungicide vinclozolin. *Mutagenesis* 11, 445–
517 453.
- 518 Hultin, C.L., Hallgren, P., Hansson, M.C., 2016. Estrogen receptor genes in gastropods:
519 phylogenetic divergence and gene expression responses to a synthetic estrogen. *Comp.*
520 *Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 189, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.07.002>.
- 521 Jancova, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E., 2010. Phase II drug metabolizing enzymes.
522 *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacký Olomouc Czechoslov.* 154, 103–116.
- 523 Julien, O., Wells, J.A., 2017. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* 24, 1380–1389.
524 <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44>.
- 525 Kevekordes, S., Gebel, T., Pav, K., Edenharder, R., Dunkelberg, H., 1996. Genotoxicity of selected
526 pesticides in the mouse bone-marrow micronucleus test and in the sister-chromatid exchange
527 test with human lymphocytes *in vitro*. *Toxicol. Lett.* 89, 35–42.
- 528 Knet, M., Wartalski, K., Hoja-Lukowicz, D., Tabarowski, Z., Slomczynska, M., Duda, M., 2015.
529 Analysis of porcine granulosa cell death signaling pathways induced by vinclozolin.
530 *Theriogenology* 84, 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.028>.
- 531 Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niiyama, K., Kobayashi, K., 2004. Screening for estrogen and
532 androgen receptor activities in 200 pesticides by *in vitro* reporter gene assays using Chinese
533 hamster ovary cells. *Environ. Health Perspect.* 112, 524–531.
- 534 Lemos, M.F.L., van Gestel, C.A.M., Soares, A.M.V.M., 2010a. Reproductive toxicity of the endocrine
535 disrupters vinclozolin and bisphenol A in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Latreille, 1804).
536 *Chemosphere* 78, 907–913. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.063>.

537 Lemos, M.F.L., van Gestel, C. a. M., Soares, A.M.V.M., 2010b. Developmental toxicity of endocrine
538 disrupters bisphenol A and vinclozolin in a terrestrial isopod. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 59,
539 274–281. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9474-9>.

540 Lockwood, B.L., Connor, K.M., Gracey, A.Y., 2015. The environmentally tuned transcriptomes of
541 Mytilus mussels. J. Exp. Biol. 218, 1822–1833. <https://doi.org/10.1242/jeb.118190>.

542 Loutchanwoot, P., Wuttke, W., Jarry, H., 2008. Effects of a 5-day treatment with vinclozolin on the
543 hypothalamo-pituitary-gonadal axis in male rats. Toxicology 243, 105–115.
544 <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.09.025>.

545 Martínez-Paz, P., Morales, M., Sánchez-Argüello, P., Morcillo, G., Martínez-Guitarte, J.L., 2017.
546 Cadmium in vivo exposure alters stress response and endocrine-related genes in the freshwater
547 snail *Physa acuta*. New biomarker genes in a new model organism. Environ. Pollut. 220, 1488–
548 1497. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.012>.

549 Martín-Folgar, R., Aquilino, M., Ozáez, I., Martínez-Guitarte, J.-L., 2018. Ultraviolet filters and heat
550 shock proteins: effects in *Chironomus riparius* by benzophenone-3 and 4-methylbenzylidene
551 camphor. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 25, 333–344. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0416-1>.

552 Martín-Folgar, R., Martínez-Guitarte, J.-L., 2017. Cadmium alters the expression of small heat
553 shock protein genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. Chemosphere 169, 485–492.
554 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.067>.

555 Neave, M.J., Streten-Joyce, C., Nouwens, A.S., Glasby, C.J., McGuinness, K.A., Parry, D.L., Gibb,
556 K.S., 2012. The transcriptome and proteome are altered in marine polychaetes (Annelida)
557 exposed to elevated metal levels. J. Proteomics 75, 2721–2735.
558 <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.031>.

559 Oppold, A., Krefß, A., Vanden Bussche, J., Diogo, J.B., Kuch, U., Oehlmann, J., Vandegehuchte,
560 M.B., Müller, R., 2015. Epigenetic alterations and decreasing insecticide sensitivity of the Asian
561 tiger mosquito *Aedes albopictus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 122, 45–53.
562 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.036>.

563 Pang, X.-Y., Cheng, J., Kim, J.-H., Matsubara, T., Krausz, K.W., Gonzalez, F.J., 2012. Expression
564 and regulation of human fetal-specific CYP3A7 in mice. Endocrinology 153, 1453–1463.
565 <https://doi.org/10.1210/en.2011-1020>.

566 Paoloni-Giacobino, A., 2014. Epigenetic effects of methoxychlor and vinclozolin on male gametes.
567 Vitam. Horm. 94, 211–227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800095-3.00008-0>.

568 Pearl, L.H., 2016. Review: the HSP90 molecular chaperone-an enigmatic ATPase. Biopolymers
569 105, 594–607. <https://doi.org/10.1002/bip.22835>.

570 Radice, S., Marabini, L., Gervasoni, M., Ferraris, M., Chiesara, E., 1998. Adaptation to oxidative
571 stress: effects of vinclozolin and iprodione on the HepG2 cell line. Toxicology 129, 183–191.

572 Raftos, D.A., Melwani, A.R., Haynes, P.A., Muralidharan, S., Birch, G.F., Amaral, V., Thompson,
573 E.L., Taylor, D.A., 2016. The biology of environmental stress: molecular biomarkers in Sydney

- 574 rock oysters (*Saccostrea glomerata*). Environ. Sci. Process. Impacts 18, 1129–1139.
575 <https://doi.org/10.1039/c6em00322b>.
- 576 Ronis, M.J., Celander, M., Badger, T.M., 1998. Cytochrome P450 enzymes in the kidney of the
577 bobwhite quail (*Colinus virginianus*): induction and inhibition by ergosterol biosynthesis inhibiting
578 fungicides. Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 121, 221–229.
- 579 Ronis, M.J., Ingelman-Sundberg, M., Badger, T.M., 1994. Induction, suppression and inhibition of
580 multiple hepatic cytochrome P450 isozymes in the male rat and bobwhite quail (*Colinus*
581 *virginianus*) by ergosterol biosynthesis inhibiting fungicides (EBIFs). Biochem. Pharmacol. 48,
582 1953–1965.
- 583 Romiguier J, Gayral P, Ballenghien M, Bernard A, Cahais V, Chenuil A, Chiari Y, Dermat R, Duret L,
584 Faivre N, Loire E, Lourenco JM, Nabholz B, Roux C, Tsagkogeorga G, Weber AA, Weinert LA,
585 Belkhir K, Bierne N, Glémin S, Galtier N. 2014. Comparative population genomics in animals
586 uncovers the determinants of genetic diversity. Nature 515 (7526):261-3.
587 <https://doi.org/10.1038/nature13685>
- 588 Sánchez-Argüello, P., Aparicio, N., Fernández, C., 2012. Linking embryo toxicity with genotoxic
589 responses in the freshwater snail *Physa acuta*: single exposure to benzo(a)pyrene, fluoxetine,
590 bisphenol A, vinclozolin and exposure to binary mixtures with benzo(a)pyrene. Ecotoxicol.
591 Environ. Saf. 80, 152–160. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.02.029>.
- 592 Schuetz, E.G., 2001. Induction of cytochromes P450. Curr. Drug Metab. 2, 139–147.
- 593 Scott, A.P., 2013. Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? II. Critical
594 review of the evidence that steroids have biological effects. Steroids 78, 268–281.
595 <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.11.006>.
- 596 Scott, A.P., 2012. Do mollusks use vertebrate sex steroids as reproductive hormones? Part I:
597 Critical appraisal of the evidence for the presence, biosynthesis and uptake of steroids. Steroids
598 77, 1450–1468. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.08.009>.
- 599 Sierra-Santoyo, A., Angeles-Soto, E., de Lourdes López-González, M., Harrison, R.A., Hughes,
600 M.F., 2012. In vitro metabolism of the anti-androgenic fungicide vinclozolin by rat liver
601 microsomes. Arch. Toxicol. 86, 413–421. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0762-6>.
- 602 Skinner, M.K., Anway, M.D., 2007. Epigenetic transgenerational actions of vinclozolin on the
603 development of disease and cancer. Crit. Rev. Oncog. 13, 75–82.
- 604 Southon, A., Burke, R., Norgate, M., Batterham, P., Camakaris, J., 2004. Copper homeostasis in
605 *Drosophila melanogaster* S2 cells. Biochem. J. 383, 303–309.
606 <https://doi.org/10.1042/BJ20040745>.
- 607 Tian, S., Pan, L., Zhang, H., 2014. Identification of a CYP3A-like gene and CYPs mRNA expression
608 modulation following exposure to benzo[a]pyrene in the bivalve mollusk *Chlamys farreri*. Mar.
609 Environ. Res. 94, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.11.001>.

610 Tillmann, M., Schulte-Oehlmann, U., Duft, M., Markert, B., Oehlmann, J., 2001. Effects of endocrine
611 disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part III: cyproterone
612 acetate and vinclozolin as antiandrogens. *Ecotoxicol.* 10, 373–388.

613 Tran, T.K.A., MacFarlane, G.R., Kong, R.Y.C., O'Connor, W.A., Yu, R.M.K., 2017. The constitutively
614 active estrogen receptor (ER) binds and activates the promoter of the vitellogenin (Vtg) gene in
615 the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*. *Mar. Pollut. Bull.* 118, 397–402.
616 <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.02.060>.

617 Uzumcu, M., Suzuki, H., Skinner, M.K., 2004. Effect of the anti-androgenic endocrine disruptor
618 vinclozolin on embryonic testis cord formation and postnatal testis development and function.
619 *Reprod. Toxicol.* 18, 765–774. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.05.008>.

620 Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of
621 oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol.*
622 *Environ. Saf.* 64, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>.

623 van Ravenzwaay, B., Kolle, S.N., Ramirez, T., Kamp, H.G., 2013. Vinclozolin: a case study on the
624 identification of endocrine active substances in the past and a future perspective. *Toxicol. Lett.*
625 223, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.03.029>.

626 Vandegheuchte, M.B., Lemièrre, F., Vanhaecke, L., Vanden Berghe, W., Janssen, C.R., 2010. Direct
627 and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA
628 methylation. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 151, 278–285.
629 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.11.007>.

630 Wu, Y.H., Wu, T.M., Hong, C.Y., Wang, Y.S., Yen, J.H., 2014. Screening differentially expressed
631 genes in an amphipod (*Hyalella azteca*) exposed to fungicide vinclozolin by suppression
632 subtractive hybridization. *J. Environ. Sci. Health B* 49, 856–863.
633 <https://doi.org/10.1080/03601234.2014.938556>.

634 Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST:
635 a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13,
636 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.

637

638 **Captions**

639 **Figure 1.** Diagram of the *P. acuta* proteins identified as putative mRNAs and their conserved
640 domains. Each domain is shown in a different color. The domains were defined with the Conserved
641 Protein Domain Family database. The size of the identified protein is indicated. Diagrams were
642 designed with DOG version 2 software.

643 **Figure 2.** Expression levels of detoxification genes after 24 h *in vivo* exposure of *P. acuta* adults to
644 0, 20, or 200 µg/L Vz (n=9 per treatment). Transcript levels were quantified by qRT-PCR using
645 *rpL10* and *GAPDH* as reference genes. Results are represented by whisker boxes. The horizontal
646 line within the box indicates the median. The boundaries of the box indicate the 25th and 75th
647 percentiles, and the whiskers indicate the highest and lowest results. The mean is indicated by the
648 small circle inside the box. The treated animals were compared to control. *Significant difference (p
649 ≤ 0.05).

650 **Figure 3.** Expression levels of stress-related genes after 24 h *in vivo* exposure of *P. acuta* adults
651 with 0, 20, or 200 µg/L Vz (n=9 per treatment). Transcript levels were quantified by qRT-PCR using
652 *rpL10* and *GAPDH* as reference genes. Results are represented by whisker boxes. The horizontal
653 line within the box indicates the median. The boundaries of the box indicate the 25th and 75th
654 percentiles, and the whiskers indicate the highest and lowest results. The mean is indicated by the
655 small circle inside the box. The treated animals were compared to control. *Significant difference (p
656 ≤ 0.05).

657 **Figure 4.** Expression levels of *ER*, *Hsp90*, *Casp3*, and *ATOX1* after 24 h *in vivo* exposure. Animals
658 were exposed to 0, 20, or 200 µg/L Vz (n=9 per treatment). Transcript levels were quantified by
659 qRT-PCR using *rpL10* and *GAPDH* as reference genes. Results are represented by whisker boxes.
660 The horizontal line within the box indicates the median. The boundaries of the box indicate the 25th
661 and 75th percentiles, and the whiskers indicate the highest and lowest results. The mean is
662 indicated by the small circle inside the box. The treated animals were compared to control.
663 *Significant difference (p ≤ 0.05).

664

Figure 1

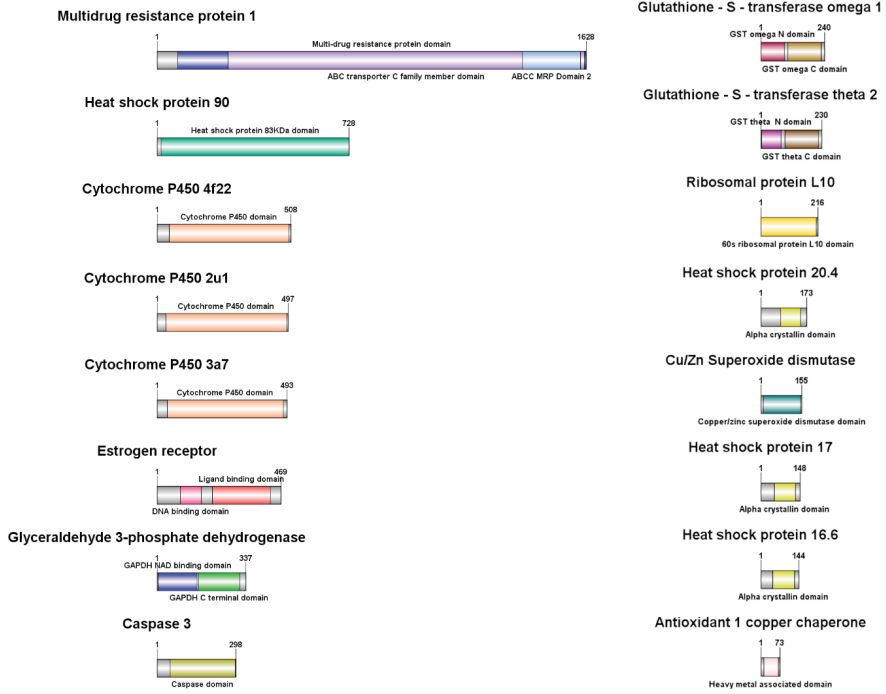
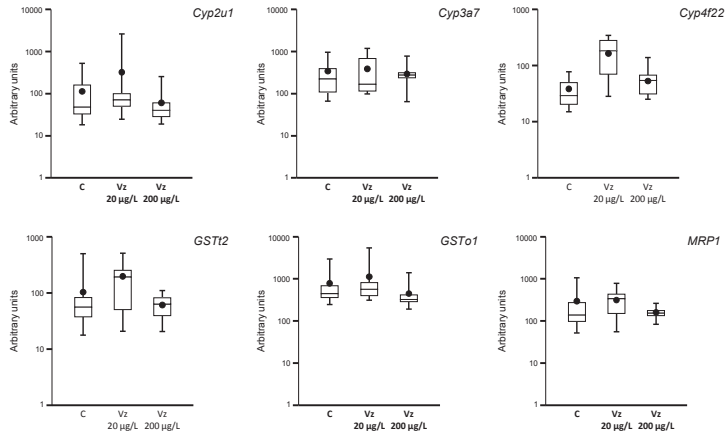


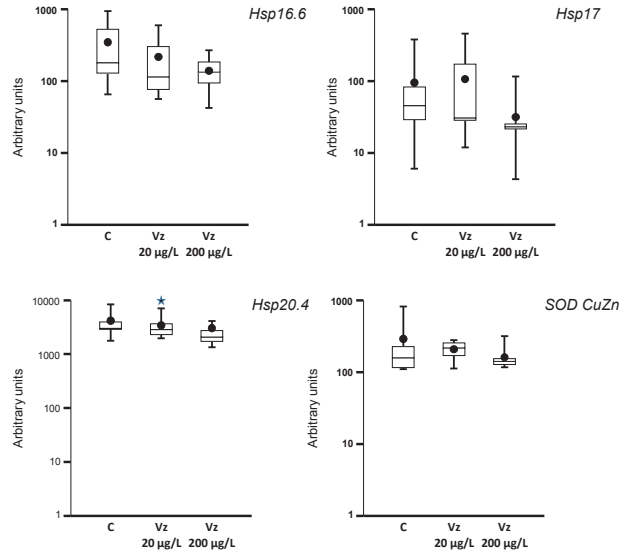
Figure 2



668

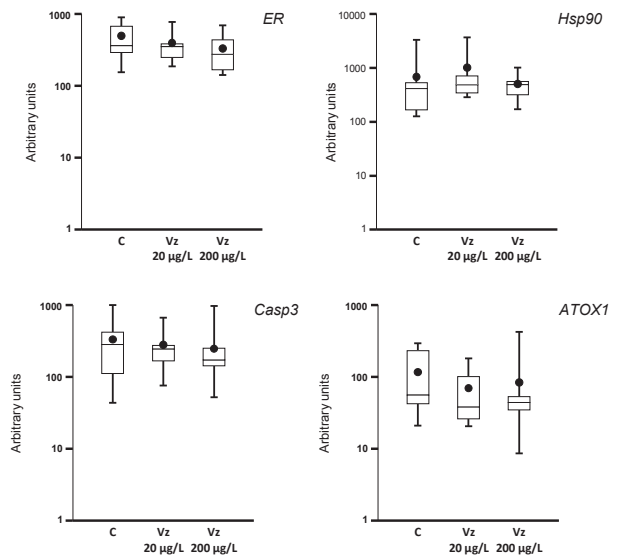
669

Figure 3



670

Figure 4



671

672

Figure01

[Click here to download high resolution image](#)

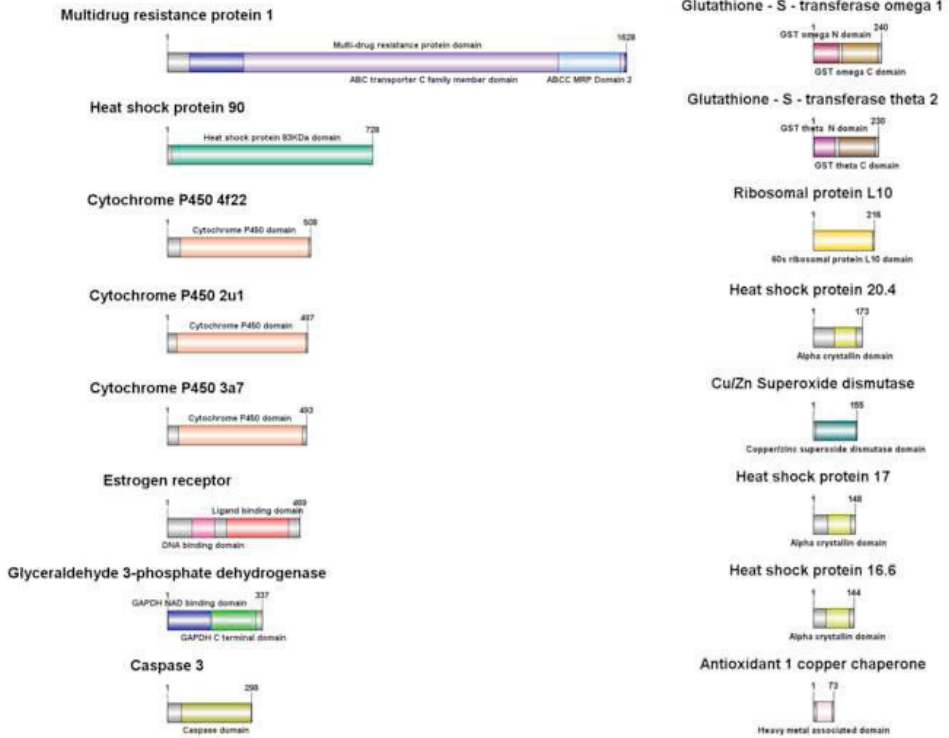


Figure02

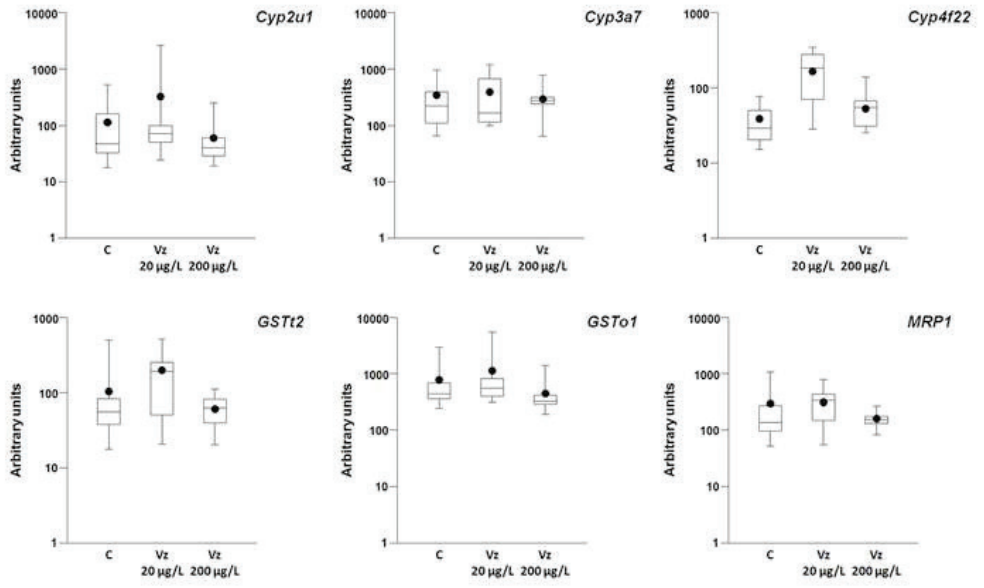
[Click here to download high resolution image](#)

Figure03

[Click here to download high resolution image](#)

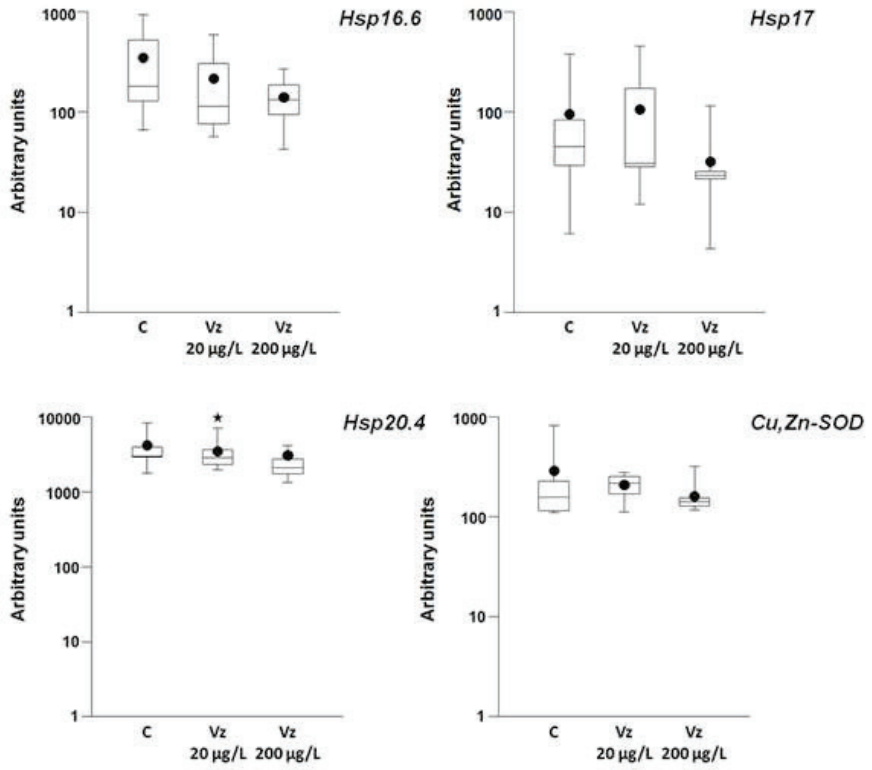
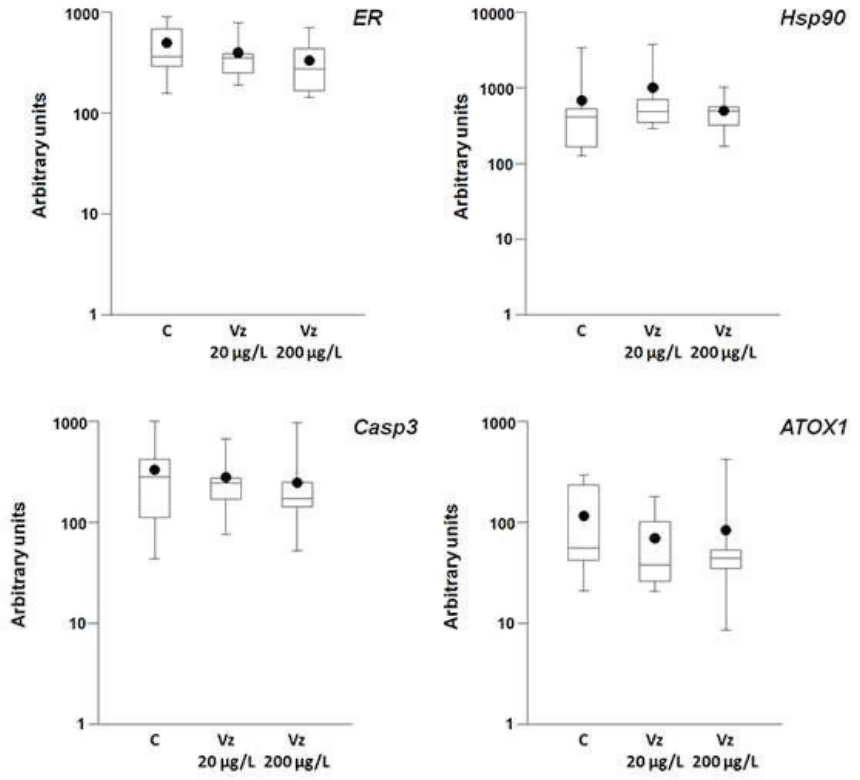


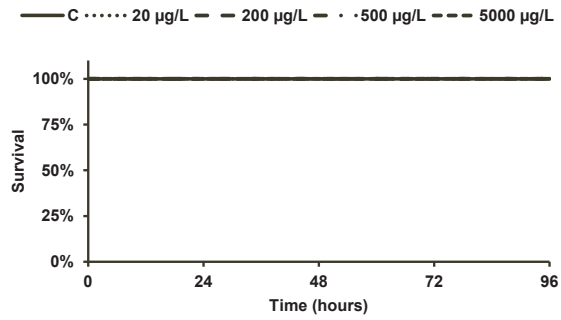
Figure04
[Click here to download high resolution image](#)



Supplementary Material

[Click here to download Supplementary Material: Supplementary material.docx](#)

Survival



C3908 - Gst t2 (REV) MG253803

TAAAAACACAAGCAAACTCTGAGTAAAATAGTCATTGGCAACACTAACAACTACAACCTTAAAGAACAAAGTTACATATGTAAAAAC
 ATTTATATAAAATTAACATTATAAAATCACAAATTGTAACAACGGAAAAGGTGGCTGAATCAGTTCAAACTAGCAGAGCATTACAT
 ATTGCAAAATATTTGGCAAGAAAATAAGGAGATTGATCCAACAAAAAATTAATAAATGTTTAAATTTTTATTTAAAAAATAACTA
 GCACACTCTTGAGGTAATTATTCTTAAATAAATATTTTTATAGGAATTTATAACAAAAATTTAGTATATGTAGTGAATTACAATGAA
 AAATAGTTGTGGTGTGAAACAACTGAGAACATTTTATCACCAGATCAGTTAATGTAAATGGCTAGCATTGATAAAAACTAAAC
 CAATAGAAAATATACCCACTATAATCTCCTCAAATGTAGAACAAACGCCTTGCCTTTATTTGCAAAAAAAAAAATTTACAAG
 CTTTCGATAAAATTA**GAGCTTTGAAGTAAGTCTTATAAACATCATGAGTCTATAAACCTTTTATGTGCTTCATCAAAGTATG**
GATTTGTTCTTTTTACTTCTCCATCCAAGATTTACAATGGGGATTCTTCATACAAATGGTGCTCATGACACGCATACAAT
TGCATTAACCTACAAACACCAAAAAGATCAGCAATAGATAAAATCGCTTCTCCACCTAAATAAGATTGGTTTTTCAAAAAATAA
GACTCCAACCTGTGAAACCACTTTTATTTCTCCTGTATTTTTCAACTTCTGCTGATTGATTGGTTTTCCAGTGGCTTATAGG
TATAATAAGCAATTGTTGAAAGAGTTGTGCACATACACCTCTAGTGTGAAATGCTGCCAGTGAAGGTAAGTCTTCTACTCGTGC
TTGTTTTTAAATATACTGAGGGAACCAATGATCACAAGATCATATTTGCGAATCACATACTTCAAATAGCAATACTTTCT
GTTAATCGAAATCCATCATCAATAGCAGGCACTAAAGAAAATGGGTTTATCTTTTATATTCATCACTGTAATGTTACCTT
TTCTGAGCGCAACAGGTTTCTCAATGGGACATTGTTCATACGCAAAAACATATAAACTGCTCTAGACGGCTGCGATAGA
AGATCGAAATAGTAGCGAAGTGGCATTTACAATTTTGCAAAGCTAATCCAAAAATATAAAAAAACAATTAACGTGTGTCA
 CTGTGTAGTGTACTGTAGATTACAGGTTGTAATGTAACACTACAGTACTAGATCTAGAATCGAGGCGAATAATAA

ORF

MPLRYFDLLSQPSRAVYMFRLMNNVFPESKPVALRKGHEYSDEYKKNPFSLVAIDDDGFRLTESIAIKYVIRKYDLGDHWFQYNL
 KKQARVEEYLHWQHFNRGVCAQLFQQLIIPKATGKPINQVEKYREKIVMVSQLESYFLKNQSYLGGSDLSIADLFGVCELMQL
 YACHEHLYEESPIVKSWMKVKKETNPYFDEAHKMVYRTHDVYKQVTSKL

C16999 - rpL10 (REV) MG262476

TTTTTTTTTACACTAACAAAGTGTATTATCAGTCAGAAATTAATATTCA**GCTAGCGGTCTGTCTGCTCTCCAATCAATAAGTGG**
ACCATGGTTCGGCTTGTACTGGACCAACACCATCAGGGACTAGTTACCCTCAGCTCGCATACGTTCAATCAGTACGTGG
CCACTTTGTGAAACCCACTTCTTGAAACAACAATCTTTGTCTGCTGGGATTTGAATTTGGCAGCAGAAAGAGCTCAATT
ACTTTAGTTTCATCAGCCTCAGTGCACGCACTGACATAATAGGCTGTCCAATGTTACTCTAGCCACTGTACCTTGAGGTTTGC
CAAAAGCTCTCTCATACCAGTCTGGAGCCTATCAGCCCAGCGCAGACAACATTTATTGATTGGTTGATGTGAAAGGGGT
GCAACCTCACACGCAGATGGAAAGCATTTTGCCACAGTTTTTAACCAAAATTTGTTAGCGCAGATGCGTCCAGCTTCAAAG
CTTCAGATGAGAGCTGTTCATATTCATCTGAGATCATGTGGACACACAGTGGAAACTCATCTACTCTAGCCTTCTTGGGCCCA
AATCAAAAATCCTAATCTGGGATCAGGAACACCACGACAGAAAACGAGATTTGGATAAGGTTTATTTTACAGTAACGGTAG
CATCGAGCTGGTGGCGGACCCATTGTTATGGGTTGTTGTTTTCCGACCCAGAAAAAGAGGAAGAAGTTAGCCTAACCGGAAGG
 ACTAGTCATGTCGTGGCG

ORF

MGRRPARCYRYCKNPKYPKSRFCRGPDPKIRIFDLGRKKARVDEFPLCVHMISDEYEQLSSEALEAGRICANKYLKNCGKDAFHRLV
 RLHPFHINRINKMLSCAGADRLQTMRGAFGPKPQGTVARVNIGQPIMSVRAREADETKVIEALRRAKFKYPGRQKIVVSKKWGFTKW
 PRDYERMRAEGLVDPDGVGVQYKPNHGLIDWKDRQTAS

C17160 - GAPDH MG262477

AAAAGTTTAGACATGCGTAGTACACACCAGTTAATTCTCTCGACTAAGCTATCATTCTTAACCGGACTCTTAGAAATCATTAAA
 ATTTGACCAAC**ATGCTGAACTTAAAGTTGGAATCAATGGATTGGACGCATCGGACGCTCACACTAAGATGTCTCTTCAA**
AGGGAGTTAAAGTTGTAGCAGTCAATGATCCCTTTATTGGTCTTGATTACATGGTTACATGTTTCAGTATGATTCTACACATG
GTAATTTAAGGGATCTGTTTCACAGAAAGATGGAAAGTTGGAGATTGATGGACAACTCATCACTGTTTTTGCAGAGCGTGAT
CCAGGGGCCATTAAGTGAATCTGCAGGTGCTGACTATGTTGTTGAGTCAACAGGTGTTTCACTACAACGACAAGGCAT
TGTTATATCAAGAGTGGTGGGGCATCAAAGTTGTGATTTCTGCTCCATCTGCAGATGCACCCATGTTTGTATGGGTGTCAA
TGAAGATAAATACACTAAGGATATGGCTGTTGTCAGCAATGCTTCTTGCAACAACCTGTTGGCACCTCTTGTCAAAGTTAT
CAATGATAATTTTGAATTTGTTGAGGGACTTATGACAACCGTGCATGCTGTTACAGCCACAAAAAACTGTTGATGGGCCCA
GTAACAAGGACTGGCGTGGTGACGTTGCTTCCAGAACATCATCCCATCTTCACTGGAGCAGCCAAAGCTGTTGCAAAA
GTTATTCCTCTGTAGATGGAAAACGACTGGAATGGCTTTAGAGTCCCTGTTCTGATGATCAGTTGTTGATCTTACATGCA
GACTTGAAAGAGGGGCATCCTATGACGATATAAAAAAGCTATCAAGGCTGCATCTGAAGGACCCCTGAAGGGCATCTGGG

TTATACTGATGACGAGGTTGTGCCAGGACTTCTGGGAGATGACAGAAGCTCTATTTTTGATGCCAGGGCTGGCATTGCCTT
GAATAATAACTTTGTTAAACTGGTGTGATGATAATGAGTATGGCTACAGCAACCGTGTAGTTGAGCTTATCCAGCACA
TGTTCAAGGTCGACAACCAATAAATTAATCATTAGCACTAGAAAATAATTTCCCAAGTTTAGGTATGTCAGCTGAACACTAAA
AACGCTGGTAAAAATTTCTTACTTTAGGATTCATGTCATTGGTGTACAATTTGTAAGCTGTTTCAGCTTTGTCATCATCAAACATG
GGAGATTATCTTAAATGTGAAGACTCTAATTTTTATGCTTTTTCTTAAAAACTTTTATGTAGCTGTGCATATGAGTGTCTGCAT
AAATGACGCTAGAATAATTTATCATAGTGACATTTTTAGATGTATGAATGGCTGCAGCACAATGTAATACATTTGAGGCTATACA
ATCCCGAGCTAATTGACCCACTAATTTCCAATAATCTGATAAATTTCCCTGTATCTGGACTGTGGTTCAATTTACAGGAATTTTT
TTATGCCACCTACAATCTCACTTTCTGCAATCTTTTTATTATAAATTCCTGAATTGTCTAGTTAGTTTACAGTACCAAGTAGTACATA
AATATTGTGACTAGTAAATTTGCTGGTCACTTGTTCAAAAAGTTGCAAAAAATAAATTTGTTGTTGAGTATTTTCAATAAAT
ATGGAGGTAAAAAAA

ORF

MPELKVINGFGRIGRRLRCLALQKGVKVVAVNDPFIGLDYMVMFYQYDSTHGKFKGSVSVQKDGKLEIDGQLITVFAERDPGAINWK
SAGADYVVESTGVFTTDDKALVHIKSGGASKVVISAPSADAMPFVMGVNEDKYTKDMAVVSNASCTTNCLAPLVKVINDFGIVEGL
MTTVHAVTATQKTVDGPSNKDWRGGRGAFQNIIPSSSTAAGAAKAVAKVIPSVDGKLTGMAFRVPVDPVSVVDLTCRLERGASYDDIKKA
IKAASEGPLKGILGYTDDDEVVSQDFLGDDRSIFDARAGIALNINFVKLVSWYDNEYGYSNRVVELIQHMFKVDNQ

c18996 – CYP2U1 (REV) MG262478

TTTTTTTTGGGGGGGGGGGGCTTTCAGCATTGTAAAAATTTGCACTGATGTTCCCTA**GCTTCTCTACTATTCTAACTT**
CATACGGCATCGGCGAGGCCGAGAACCCAAACACGCTTCCATTGAGGGCGGACTGGCAGCATCGAGGGCAGGAAGTGGG
ACTTCTGCAACAGCGTGGCCAAAGTACAGGAACAGCTGCATGTTGGCCAGGGCCTCGCCAGGCACATCCGGCGGCCATAGA
GAAGGGAAACAACTCTCACGTTCTCAGCTTACCGTCTCGCTAGAAATCTCTGGGGGTTAAAGGTTAAAAATCTCTGGCC
CCAGATGTTCCGGTCTGGAGTACAGAGCTGAGGTTGGGGTAGATGTAGGTGCTTATAGGTATCTGTAGCCTCGAACGTAG
ACATCCCGGGGACAGGTGTGGGGTAAAGCAAAGGGAACAGTACTGCTCAAACGCTGGGTCTCCATGATAAAAGCGGTAACG
TAGGCTAGTTTGGGCTGTCTTTGAAACAAGGAAGTCTGTCCAAGCCACAGTGTCTGTATTTCTCGTACGCTTCTTCTGAT
ATTCCGGGAAGTTGATCGCGTAGAGGATGACCACGACAACGATGAGGACATGGAGAAGGAACCCCGATGAAAAGATCAA
GAACGATCTTCGTGAGGTTGCTCCTCGCTCATGTTCTGCTCGCTTCTCCCTTTCAGCTCGTTCATTTCCGCCGTGTACGCCGCG
ATGAAATCCCGATGTTGTGTTGTTAAACTCCGCTTCCCTTTCAGAACTGACGAACTCTCGTAAAAAACCCAGCAGAGTTTGA
AGGTTTTTCGCGCTCTTTTCGCTTGAAGACGCTCAAATGGGATGATTTGAGCATGGGGATGAAGTTGATAACGCCATTGGA
TTGTTGTCGCTTAAAGTCGCCATGTAACCGGATATCAGTCTTTGGAGTCTGGCGTCTGACTCGAACCTCTGACCAAAAAT
AATGGAGCAGACGATGTTCCGCATGCTGACATTCTGTCAGTCTTTAATATCCACGGGCTGTCCGTTGAAACTGGCCAGGAGAT
CAGCGAAAAATGAGATTTCTTCTGGATTTTTTCGGCCAAAATATTTTTACCAGGCCAAAGTTTCTAAGAAATTTGGAGCGTGA
CTTTTTTTGTTCTTTCCATTTTTGACCGGAGGCCATGACAAACGCCAGCCGCAATGCCAGTTTCTCGTCCAGAAACAACTTT
GGCCGGTCCGAGAAATCATCCGGTCTGCTGACTAGAGTCTCTTGAGGAGCTGATAGCCATTAACACAACGATCATGGTGCC
GCCTATGTACACACTAAACAAATCCCACTGTTCCCGCATTGTTTGAAGTGGGGTCTCGGGTCTTCTGACGAGCAAGAG
ATGACCCACGAAGGGCAGGGTTCGACACGGAGAAGCGGGAGCTTAGGGTACGCCGGAACACAGAGGTAGGTACAGGA
GCAGGAGGGTCAACCGTCCAAGGAGGGTGTGAAAGTCTGCGGTACCGGTAACATCTTTGTGACCAATAGTTACCTAAGGCA
TAAATATCAATATGAGACACAAACAGCAATGAACCGTCCCACTAGGCTATGGACGAGTTCATTTCTGTCTTTGAAATAG

ORF

MFTGTDFTLLGAVTLLLLTYLWCFRRDPKLPSPCRPLPFVGHLLLQKDPKQFKQWREQCGLDFSVYIGGTMIVVLNGYQLLKET
LVQRPDFFSDRPFKFLDEETGIGGLGVVMASGQKWKQKQVTLQLRNFGLGKNILAELQEEISFFADLLASFNGQPVDIKDVTNVSM
ANIVCSIIIFGQRFEYSARLQRLISGYMATLSDQQSNGVINFIPLMKYIPFDVFKAKRGAKNLQTLGLFREFVVLKGTKEFNEHNIGNFIA
AYTAEMNELKGNKNEATNMSEDNLKIVLDLFIGGSFMSHTLSWCILYAINFPEYQKKAYEIEHDTVGLDRVPCFKDRPKLAYVTAFAIME
TQRLSSTVPFALPHTCPRDYYVRYGKIPKGTIYIPNLSSVLHDPNIWQDVLTFNPRFLDEDEGLKRTREEFVPSMGRMRMCLGEALN
MQLFLYLATLLQKFLPVDAAASPPSMEDVFGFSASPMPEYRIVERS

C21540 – Heat shock protein 20.4 (Hsp 16.1-like) MG262479

GTCTGCCATACCTGAGCCATGACGCCGTGAGATGATCTCATCGGGCACCCAGGGCTGGAATCGTCTGGTACGAACTGGGCCCA
GTTCTGCTGTGACACACAGGTGTGAGTTCTATATAACCAGGCGAGCTATCGGCCACGGCACCATTGAAGCAACATCTCACACCCG
TGAAGGTTTCGATCTCAACTACAAGAACTTTGACAACTAACGCCTTCCAGTTTTCTACACCAAGAAACAACCTCGGAAGACACCAA
AGAACTCATCAAGTAACAAGTTTCGCTAGACAAACCAAGCAAGAACTTTGATCGTCTGCTCCAACAGTACAAGACA**ATGGAACA**

TCTAGTGCCCTCAGACGTGAGAACTGGAGCTTCTCGAGAGACAGAGACAGGTCTTCAGCGACATCTTCAAGGGCATGGACA
 AGGACATGGACACGGAGTGAAGGAGTTTGACCCGAGTTGGAGAGGATGCGCAGCGAGATGTTCCACCTCAAGGCCCTCG
 ACTCAACGACTTCGGCTCGTCCATGATCAAACCCGAGCGGCCATCGTGTCTGACGAGCAGGGGAACAAACGGCTGTCTCTC
 AGGTTTGATTGAAAGACTTTAACTGAAGAGATTACAGTGAACACTATCGACAACAACTGATGGTACAGGCCAAACATA
 CAGAGAAATCACCCGGCAGAAAGGTACCGTGAATTCAGCCGCCAGTACGTGCTGCCCCAAAAGATTGACCCGCTCAGCTTG
 AACTCAACGTTAGCAGCAGACGGCGTTCTCAGCATTGAAGCACCTGCACCAGCCGATCGAGGCTCAAGGGAGAGAATTCT
 TCCAATTATGCGTCTCTAAAAATTTTATTATTACCTTTCTTTTATTGAAATTTGATTTCAAGGTTGAAAAAAAAAAACATTTATA
 AAAAAAAAAATAAAAAAAAAAGCCAGAAATAATTGATGTATTAATGTTAAGAATACATGAATCGATTTTTTTCCACCGCAA
 ATTATATTTTTTTTGAATACAACAATATCAACAAAATTGTATGACTGTTTTAAGAACCAATGAAGTTTTGTGCTGCAACA
 TTTTATTGTGAGTGAACGTGACTTAATTGTTGCTCGGGCGCTGTTGTTGTTAATTTATTACACGCTCCACTTGAATAAAGGTT
 TTTAAAAAAA

ORF

MEHLVPLRRENWSFFERQRQVFSDFIKGMDKMDTEWKEFDRELERMRSEMFTLKALDFNDFGSSMIKPERPIVSEQGNKRLSLR
 FDCKDFKPEEIVKIDNKLMLVQAKHTEESPGRKVVYREFSRQYVLPQKIDPLSLNSTLAADGVLSIEAPAPAAIEAPRERILPIMRL*

C21800 – Gst o1 MG262480

TAAACTTTAACTGTGAAGACTGTCTCCTGTCTGCGAGTAAAAAATCAGTTGTAGTGTAGACCTTATGATTATCAAACAAAGTGT
 TACTACTGTTATGTAAGCCTTGCTCTAGATCTATAAAATCCAGATCTAAAACGAGATTTCTGATCTAGCAAGTTTGACAGAAGCT
 AAAATATTTTTTATATTTAGATTTAAAGCTCAACACTGGCACTCAAAGACTACGCACTGTTTGTAAACTGTCAAAC
 CCTAAAATTATGACACAAAAATCTTTTCAAAAAGGAACACCCTTCCACCCCTACAGCCAGGGCTTCTCAGGCTGTACAGCATG
 AGATTTTGTCCATTTGCACAAAGAAGCAGACTGGTCTCTTTACAAAAACATTCGGTTGAAACAATTAATGTCGATTTAAAA
 CAAAACTGAATGGTCTTTGATAAAAACCCCTTGGTCTGGTGCCAATTGTGGAACAGATGACAAGATAGTTTATGAATCC
 ACAGCCACATGTGAATGGCTTGATGACATTTACCCACAGAATAGACTCCAGCCAAGTGATCCTTACACAAGGCTTGGGACAG
 GATTCTGTTGGAGTATTTGGAAAGCTTACAACATTAATTTATGCATTCTTGAGAGAGCCTGACAAACGAGAAAAAATGTTA
 AAGAACTCAAAAACACTGAAGTTTTATGACGATACACTGTAAAAGGACCCGCCATTCTTTGGAGGTGAAAGCCCGTCC
 ATGATAGACTTTTACTATGGCCCCACTTTGAGCGTATACCCGCTCTGGAATCTATCGACACAAGAGCTGGAGTCAGCAAAGAC
 AACTCCCCACTGGCAACTTGGTTGATGTCAATGTGCCAGCTGCCAGCTGCAAGGCTACCATGTGGGATGCCAAAACACAC
 TTGCATTTCACTCAGTCTTACGCATCTGGCAAGCCTGATTATGATTTTGGTTGGATGAGTAGTTGGGGCTGCCGATTGTTTTG
 TCTAAGGCTGGAATTTAATGTTCCAGACCTGAAGAAGTCTAAAACACATGTAATTTTTGTCATTGATGATATGTTGTTGAGATA
 AAAATGGTGAATTTGTGATTGAAAACCTTTA

ORF

MTQKSFQKGTPLPLQPGLLRLYSMRCPFAQRTRVLVLYKNIPFETINVDLKHKPEWFFDKNPLGLVPIVELDDKIVYESTATCEWLDDI
 YPQNRQLQSPDYTKAWDRILLYFGLKLTLLIYAFREPDKREKNVKELQKHLKFYDDTLAKRTGPFVGGESPSMIDFYLWPHFERIPVLES
 DTRAGVSKDNFPLATWFDVMCQLPAVKATMWDAKTHLHFQISYASGKPDYDFGLDE

C24957 – Heat shock protein 17 (Hsp 12.2-like) MG262481

CTCTCAACAAAATGGCGTCTTTGGACTTTCCGTCAGTTTTCAAGTAAATACTTAAATAAAAGAGATTTCACTAAGATTAAT
 GAAAAGGAGTATTGTTGAGAGAAAATGCTGTTTCAAAAATGAAAACCTCAAATTTAAAAAGTCTACTTTTGTCAAGTTGTTACAA
 TTGATAGAATTTTCTCGATCTATCAGATGTGTTTCGATTGACTCACCAGCTGTGGTCAAGGCCACCATAATGATAATCTCG
 AAGCCTCCAGAGCCATGGTATATAAATGACAGTGTCCAAAATACTTCGTTAAATCTGACGAGTACGGTAACTGGTAAACAAT
 CCAACCTTCGTGCTACATCGACTCTACTAGTACTACTACATTACATTGGCTCTACATTCTACAATAACTCTACATCTGGGAATCCAA
 GTTTGAAGTGTGTTAGTACAACCTCAGTAGATCTAGTTACTGCAGTACTAGATCTCTCTACCTAACTTAAAGCTTTTCCAGAACAG
 AAAACAGAGTGAAGCTCAAAGTTTTTAGAGAGGTAGATCTAGATTAAGAAATCTTCAAAAATGTTTGGCTGTTACTCTCGAC
 TGCAAGATGATTTTGGCTACTTCTGTTGTTGATGAATTGATAAATCCATGGGATCTAAGGACCCCGATGATGTACAGAGAT
 GGCTCCCTTGTAACTTAGTGGCAGGCTTGGTGATTCTGAGATTCAGAACACTGACAAAGAGTTGAGAAATTCGATTGGATCTT
 CGCCATTACAGCCAGAAAGAGGTAAGATCACATCAGACAACCAAAAGATTACAATCACAGCTAAACATGAGGAGAAACAA
 GACAACCATGGTTTTGTGCCGTGAAATGACTAGAACATATCTTTGCCAGATGATGTTGATCCAAAGTCTGTGACATCGTCA
 ATGAATCTCAAGGAACACTTAGCATCAAAGTATCCAAGAAGGCTATCGAAGCTCCAAAAGAACTAATATTCCTATTGAGTT
 CAAAGAATAAATCTCAATCTTGAGCAGGTTCTCTGACTATTCTATCAACTAACACTTTTATTATCTCATGTACTTAAAGTAGAA
 AATGTAATTTTTCTCAAGTTTTTTTTCTAAGGGTTCATGCACAATGATCTCTCCACCCTTACCCTATGTATACATTTTATAGACCAC

CACCCCTCATGTGAAGGATACACTCACTCATAAATGACCACAATTTGGGATTTAAACATGGTTATAAAATTTAGCAATTGCGTAA
TTAATATAAAATAGAAATGCAAACCCTTGTATGTTAAAAAGGTTTACCAAACAATAATAAACCACTCACTCACTGCACTGTG
TTAATGTAATGATGTGCATGTTCCCTTATAATTTCTATCATGAAACAGATGTTTAGAGGGTCACTGAAATCACATCTGGCATTAA
AATTTCTCATGTTGTGTTTTACAGCTTAAAAATTATTTTTAACGAAGTGACAAATGTAATTCGATTTAATTATTTTTGTTT
ATAATTTCTTTTGGAAATTAATCTACAGCCTAGTCTTAATCCTGTATCCATTGTAATAAGTAACCAAGCAGGCTACTAACACAAGTT
GTTTTTTTTTTCACATTTTGCATCTTTATGGCTGTTTATAATTTATGCAAAATATTATGTAATTTTAGCACATATCACTGGATTTTCAT
GAATTTGCTGTGCTGATGTTTTTTTGT

ORF

MFAVTPRLQDDFGLLRVDELINPWLDRTPMMYRDGSLANLSGRLGDSEIQNTDKEFRIRLDLRHYSPEEVKITSDNQKITAKHEEK
QDNHGFVSRMTRTYSPLDDVDPKSVTSSMNSQGTLSIKVSKKAIKAPKETNPIEFKE

C29072 – cyp4F22 MG262482

ATAGCACTAATAGTAGACATTGGAACATTTTATTATTTTAAAAACATTTATGATTAGGACAACCATCTTTTTCAGTTGCTTATTTT
TTAAAAAGGGAGGTAACCTTGCTGCCATGGCAACCATAAACAATTAAGTTGGTGGGGCTGTGTTCTGGTGTCAATGGTTGT
GTTGCAAGTAAAGCTATCACTGCAATGTTTCTACAAGAGGCGTAGAGATCTGCTCATGAGGTTCCACAAGACCCAGCCCA
CCCTCTCTTTGGTCAATTTGCTCGATTACCCAGGACCTGATGAGAAGGGTTAGCCTACCAGAGGATGCAGACAGGGAAGTACC
CCAGAACTAACCTAGCTGGATGCTCCATACCCCATGGTCATGGTGACACATCCGGACACAGTCAAGGTTGTTCTGAAGAGTT
CAGAACCAAGGGCAAACGTATCTACAATCTTATCCGGCCGTGGGTTGGAGACGGATTACTGACCAGCAGTGGAGAAAAATG
GGCCAGGAACAGAAGACTTTGACCCAGCTTTTCAATTTGAAATCCTAAAGAATATATTGAGTTGAAGAATCGCAGTGCAG
ATCTACTGTTGCTGAAGTTCAACAAGCAGCAGAAAAAGCTCAGCCCTTAAAGTGTGTTGTAACATCAATGTTTACCTTGG
ATGTCATTTTAAATGTGCAATGCTTATGAGACTGGCTGCCAAAACCAAGGAGAGCAGCACCCCTTATGTTGAGGCTGTCAATG
CCTTATCAGAAATGATGGTCAACAGATTTTTCGACCATGGCTGCACAGTGACCTTCTCTTCTCACCCTGAAGGGAGAA
AATTTAAAAACATTGCAACTATGTACATAAAGTTGCTGAGGATATCATTAAACAGAGGAAAGAGAACTGAGAACAGAAA
GTCCAGTAAATGCTAACAAAGAAAGACATCACAGATGCATGGACTTCCTGGATATCTTGTGACTGCACATGATGAGACTGGT
CAAGGGCTGACCAATGCTGAAATAAGAGATGAGGTGGACACATTTCTTTTGAAGGTCATGACACAACCCGACGCGCCATCTC
GTGGGCTCTGATTCTATTGCTGAGCATGATGAGGTCCAGCAGCAAATTTGTGAGGAGATTGATGGGCTGATGGCCAGCAAA
ACAAGCAGGACATTTATGGGAGGATTTGTCTCAGTCCCGTATCTGACCATGGTCATCAAGGAGTCACTCCGACTCCATTTCT
CTGTGCCGTTATCCAGCGGGAAGTACAGTGGACACGGAAATGATGGCAAGATGACCGCTCTGGAACCATGGTCAACA
TTGTCAATTTAACGCTCATCAACTCTACAATTTGGGATGATTCAATGAAATTTGACCCCAATAGATTTTTGCCAGAAAATTC
AGAAAGAAGAAGTGCATATGCTTTTGTGCTTTTTCTGCTGGTCCAAGAAATTTGATCGGGCAAACTTTGCAATGGATGAAA
TAAAAATGCTTTAGCGCGCATCTTATACAGGTTCAATATCAGGCTTGACCCAGTCACAAAGTGGAGAAGCAGGAAAGCATA
GTGATGAGAGCCAAGGATGACATCCATCTGCTGGTACAGAACGCCACAATGCTTAAATGTTGAAAATTTCTTTCTGTTGAA
CATAACGCATATCATATAGCTACATTGTTTAAATTTCTATTGAAAAAGCTTGCATATTAATAGGAAATGAAAGTTTACTTACA
TGATAG

ORF

MATITNYLVGAVFLVSMVVAVKAITAMFSYKRRRDLRMRFPQDPAHPLFGHLLDYPGPDEKGLAYQRMQTGKYPRNLAWMLHT
PMVMVTHPDTVKVVKSSSEPKGKRIYNLRPVWVGDLTSSGKWARNRLLTPAFHFEILKNYIELKNRSADLLLLKFQAAEKAQPF
KVFVNITMFTLDVILKAMSJETGQCNQGEQHPYVQAVNALSEMMVNRFFRPWLHSDLLFLLTPEGRKFKKHCNYVHKVAEDIKQR
KEKLRTEPVNANKERHRCMDFLDILLTAHDETGGQLTNAEIRDEVDTFLFEGHDTTASISWALYSIAEHDEVQQICEIDGLMAS
KTSTDILWEDLSQLPYLTMVIKESLRHSPVPFIQRELTVDTEIDGKMPAGTMVNIVYNAHNPITWDDSMKFDPNRFLPENSERRS
AYAFVFPFAGPRNCIGQNFAMDEIKIALARILYRFNIRLDPSHKVEKQESIVMRAKDDIHLLVTERHNA

C29700 - Antioxidant 1 Copper Chaperone (ATOX1) MG262483

GGTGTGTCAGTGAACGTTTCAATATTTCTTTAGACACATATTGCAAGTTGAAGTTTCACTTCGTTTAGCTTAAATTATTAATTA
AACAAAGATACCTATTGTATTTACCTTTTTAAAATGCCAGAAAAGACTTATGAATCCACATGGAATGACCTGTGAAGGGTGT
GCGAATGCTGCCAAGGGTATTAGGGAACTTGGGGAAAGTAAAGAGTGTGAAACAAATGTTCCAAACAAAAAAGTCACT
GTGACATCTTATAAACCTGATCAGCTCCTGGAATCTTTGAAAAAACAGGGAAGGAATGTTCTGATCATTGGTGAGAAGGC
CAATTGACCCCTAAAGACGTTTGTATGCGGTTGTATGACAGACATTTTGTGCTGCTGCAACAAGTGATTTGTATTCAAGGTTT
TAATATACAGGTTAACTATTGTTATAATTGTTGTTGTTAACTTTGCCATGGAGTAATTGTTGAGTTCTGTTTCTCATATCGACG
TTTTTATGTTAATGATTTGAAGTAACTTACCCGAGAATATTATTGAAAATATATTTGTTTACTTGAACCTAAGGAGTCTATCAT

CATTATCATCAAAAAGAAGCATTTTTGAGAATCAAAACCTTTAAAAGTATGAATTTAAAAAAGAATCGTTTACTTTTTATAGGAT
 AATATACCCATTATAATGTATGTATGGTTGCCTCATGGTTTTGCAAACACTATGTACTTTACCAGTGTGTATATAACAAGATTTCTAT
 TACAGGTAATACAGAAAACCTAATGTATCAAAATAATTAAGTAGAAAATGCACTCTATTGCATTGGTAAGATGCAAGTTAGATATC
 CACAGTAGATTGACTGTTTTAACTACTGAACCTTTCTGTTGATGTTAATTAGCTGTGATTGTTTTGGTATTTTACAATTTACTTTAAC
 TGTTTTAGACATTTTACATTTGAAATGGTCAGTTGCAGTTGATCAAAAACCTTACATTTGGTCAATTCATTAATTTTATAATATCCT
 TAATGTCATTAACCAAGATTTTTCAGTGCCATTCTATCAAAGCCAAAAGCAGTTTGTTATTCTACTTTTGTATTTAAGGCTCGCT
 GAAGGAATGAGAGGAATGATAAAAAGATTTTAGTTTTATCTGTAACCTTTAACAACCTGATTGTACTTTAAAGGTTGCTCAATTA
 TTATTTGATGAAATCTCAATTTTTGTATACATTTGTTCAATAGGCTGTTGATAATTAATAAATACTGTTATGTAATTTACTGGGT
 TACAAGAGATGACAATCTAATGCTAGTAGTCAATTTATTAGTTTTCTATAGTTATTTTGGTAACTTTAAACCAATACCTTTTTAAT
 TAAATTAGGAAACACTTAATTTACACAAAAAATCTACCAGTACTTTATTTAACTATTTGTTATTTTTAGCATGACGATAG
 TCATTGAATAATTTTTAAAAATTAGGGCTAATCAAAGAAAATGAAATAAGTAATTTGTAGTTTTAATACAAAACCTGCTCAA
 ATGTTGATGCCAACCAAG

ORF

MPEKTYEFHMEMTCEGCANAARKVLGKLGVEKSVETNVQTKKVTSSLNPDQLLESCLKTGKESYIGEKAN

C30286 – Multidrug resistance protein 1 (MRP1) MG262484

TATGACATCGTAGGAATATATTAAGTTGTTTTCAGAACCTGATCGATTTCTTTGAATAAAAAGATTTTGCAGATCATGGATAATTT
 TACATTGCCAATACTTTTTGACAATTCACGGCGCATTTTGAAGAATTCACACTTCCAGTACTACGACACATTTTGAAGAATTC
 ACACCTGCCAGTTACTACGACATATTTGAGAATTCACACTTCCGGTCCAGACCACTTTGAAAATTTTACAACAGCCGCCGTCA
 CGTTAAACAACGGGGGAGAAAACATCACTAGACCAGAAAAGTTATTTTGTGCTGACAGCATTGGGATACTGATTTGTTGTTG
 AGCTCTAGTTGGCCCCAGCTGACGTCATGTTCCAGGACACAGTTCTCATCTATGTGCCATTCTCATGCTCTGGCTGCCATTAC
 CATTCTATTTATACATGTTGGCATCAAAAAGGTCAGTCCGTTACCCATTTCTGCCTCAGCATTATCAAAATGTTCTTGGCCGC
 CTCCCTGAGCCTGCTCAGTCTGATAACTATAATAGAAGACGCCAGTAATGATACAGGGCGCACACCCATTTCCATATCACATTA
 TGTGGCTAATGGTATCCGGGTCTCATATGCTGTTGTTGCCATCGTAACCCAAATGGAGAGGAAAATACCACACCACCACTTC
 AGGATTTCTCTTCTCTTCTGGATTTGCTTGTCTGCTGTGATGTTGTCCCTCTCTACACCAAGATAATCATTAGGAACACGAAG
 GATCTCTGCTCAGATTTGCACCTTTTTGTTCTGGTGTATGCCATGGAAAGTTCTGCAACTTTTGTCAACTCTGTCTCAGATTCACC
 GGGGAGGACAGCTATCTGGCTAACTCAAGTCCAGAAGTGAGAGCTTCAATTTCCAGCAGAATTTTCTACTGGTGGGTCAACG
 AACAGTGTACAATGGTTGGAGGAAAGACTTACAGGAAGAAGATTTGTTTGTACTCAACCTAGAGATGAGATGATAACTTC
 ACACCATGTTTGATAAACTCTGGAGAAAATGAGTGGACCAGATTCAGAGGAAAAGGAAGGAAAAGTCTTATGACAAA
 TTAGGATATCGTTTGTCTGACCTCTCAAACTTATGAGAGGCACGGTGAAGGTCACCTCTGATGGCTAATATGAATGGAAA
 GGTTACTGAAAATGGGCGTTACTACAAAACCTGTTAAAATGGACAGCACTTCAAGAAAATAATACAAAACAGCCCAAGCCCTCTC
 TGTTGAGAGTTCTAGCACAGATGGTGGGATTAACCTTTGCTTTGGACTTGTCAAATAATGGTTCTGATATATTTTATGATGA
 TAAGCCCTGTGCTACTGAGCCTCTTATCAGTTATGCTGACCATGCGGATGTTGATTTTGTGGAAGGCTATGCCATAGCTG
 TCCTGCTGTTTATCACAGATGATCAAACTCTGTGCTGTTAACTTCACTTCTGGATGTCGAGATTGTTGGCATGCGATGAA
 GACCACGCTTATTCAGCTATTTATAAAAAGGCTCTAACAAATGAACAACGAGTCCAAGAAAGAATCAACAGCAGGAGAGATT
 GTCAACCTTATGCTGTGCTGACTGCCAGAGGGTCCAGGATGTGATGAATTTTTCTTCTACGCTTGGACCACTCCCTTTAGGTTA
 TTATAGCTATAGCGGTGCTGTACCAGTACATTGGCCCTCTGTATTTGCTGGTCTGGCTGTCTGTTGCTGACCATACTTTTAACT
 TCTTACGTAGCATCAAAGCAGCAGCAGCTTCAAGTCAAGAATTTAAAACAAAAGACTCCAGGCTCAGACTGACCAATGAAGC
 TCTTTGGCATGAAGGTGTTAAAATATATGATGGGAGCCACCTTTTATGAGAAAATTTGACATTTGAAAGCGAGGAAA
 CCAAAGTGTGCTACACACTCTGCTACCTCAATGTGTTTATCAGTGTCTATTCAGTGTGCTCATACTTGTGATGTTGGCCAC
 ATTTGCTGTGATGTCAGTGTATCTGATGAAAATCATTATAGATGCCAATAAAGCCTTTGTTGCCCTCAGCTTTTCAACCTTTTG
 AGAGTGCCCTTAGGGTTACTCTCTCCATTATCTCAATGAGTGTTCAGGCTGTTGTATCTATTGAGAGGATAAACTGTTTTGT
 GTACAGGAGATCTGAAAACCTGATAATGTGATCAAAGATAGTCGAGCAAATTTGCTATCGAAGTTGAAAATGGAACCTTTTACA
 TGGGACAAAGCTGAGAGCCATCATTAAAGAACATCAATCTAAAATCCCTGATGGTAAGCTGTACGCAAGTTGTTGGCCCTGT
 TGGCAGTGGGAAAAGTTCATTGGTGGCCGCCCTGCTGGGAGAGATGGAGAGGTTAACTGGGAGGGCCAGTATCAAGGACAA
 GTAGCTTATGTACCCAGCAAGCATGGATCCAGAATGCAACAGTAAAAGACAACATCCTCTTTGGGAAGCCATTTGATAAGA
 AGAAATATAACAAAGTAATTTAGCTTGTGCATTAGAAAAGAGACCTGGAGATCCTTTAGCTGGTGTATGACAGAGATTGGT
 GAAAAGGAATAAACTTGTAGTGGAGGTGAGAAAACAAAGGGTCAAGCTGGCCAGAGCGGTGTATAGTGGTGGCAACATCTTT
 ATCTTTGATGACCTCTGTCTGTGATGACACCCATGTGGGCAACATATTTTCAACAACGTCGTTAGCCATAAGGGCATCTTA
 AGGGCAAGACAAGAGTTCTTGTGACACATGGAGCCACTGGCTGCCAATGGTAGACTCTATCATCGTGTGTACGATGGAGA
 GATACGAGAGGCAGGTAGCTATGAGGACCTAATGTCACATAATGGACCTTTTGTGAGTTTATCAGGACCTATTTACTGCAAG

GGGATGATAATCCAGAGGACAGTACCAAGAGATTCAGGCTATAAGGACTAGAATCTGGAATGATGTAGAGAGTGCTACCTC
TGATGCTACCTCGGGGATGAAGGCTTACCAGGTCATCTCGTTTAGCTCGCAGACGAACTTTATCGGTAACAAATGAATCAAC
AATGACAAGTTCATTGTTGATGCGTTCACAGACCTTCATTTATGAAGAGGAAGATGACAAGGGAGATAAAAATTTAGGGAAG
CTAGTGCAGGCAGAAATTTGGAAAAGGGAAAGTAAATAGATGTCTTCTGGACTTACGTAAGGCAACTGGTACATTTG
CCGTCGGTTGCTGTTTATCTTTCCCTTTTCCAAGTGCCACCGCTGGTCAAACCTTCTAGTTAACAGACTGGACAGGGGA
TCCGTTACTGGCAATTCAGCCTCATACACACTGAAGAATACACCAGTAGGAACAATTATTATCTCTGGATCTTTGGGGTATT
TGGAATTGTTCAAGTTGGTTTCTGGTGGCCACAACATCATCTACTGGGTCAGGATGGTGGTGGCTGCCAAGAGACTCCACTT
TGGGATGCTGACCTCCATTTTAGATCGCCATGCTCTTTGATACGACCCACTGGCAGAATTATGAACCGCTTCTCCAGA
GACATAGAGGTAGTGGAACAACCTCCCATCATACAGACTACACGTCCACTCTGTTATCTGTCTGGTACCTTGATC
ATCATCTCCATCAGACCCCTCTCTTCTGACCTGGTGTGCTTATTATGATCTTGTACTACCTCATAAGAGCTTCTATGTCCA
ACATCTCGGCAGCTAAAGCGTATTGAGTCTGTGACCCGCTCCCATCTACACCCTTCTAGTGAACCATATCAGGGGGCGCC
ACCATCAGGGCTTACAATGCAGCAGAGAGGTTTCATCAAGGAGTCTAAAACCTAGGGTGGATAGGAACATGCTTTTTACTACAT
TGGCCTGGCAGTAAACAGATGGCTTGGCATGAATCTGGAGCTGTTGGCCAATATCATCTCTGGGCTCAGCCATCTTTGCTGT
CGTCACTCTGGTATAAGCGGAGGGGATGTGGGTCTGTCTGTTTCATATGCCATACAGGTTTCCAGTAATTTGGTGTGGATGGT
CAGACAAATGAGTGACCTTGAGACCAATATAGTATCCGTGGAGCGACTGAAAGAATATTTCTGAGCTGGAATCAGAGGCAGAA
TGGATTGCCCCATCGCAGGCTGTCCCCGGCTGGCCCTGGATGGCAAGTGAAGTCTCAGGCTATCAGACTAGGTACAG
AGAGGGCTGGACCTGTTCTAAAAGGCATTACCTGCGAGTTCAAACCCGGTAAAAGATTGGTATAGTAGGCAGAACAGGG
GCAGGTAAGTCATCCCTGCTTTAGCTTTGTTCCGGCTGATTGAAGCCAGAGGGCAGTATTTTCAAGTGGATGGGATCAGAAT
ATCAGACATTGGTCTCCATGATGTGCGATCAAGGCTCACTATCTTACTCAAGACCCTGTGTTATTTTTTGAACCTGAGGATG
AATTTAGATCCAATTAACGAATATAATGACCACAGCTGTGGGATGCGCTGACCACTGCCACTTGAAGATTTTTGTTGAAAA
CTTGTGAGAAGGCTGGACTATGAGGTGGGAGAAGAAGGGCAGAGTCTCAGTGTAGGACAGCGCCAGCTCGTGTGTTGGCT
AGAGCTCTGCTGAAGAAGCAAAAATTCATCTTGGACGAGGCCACGGCTGCTGTTGACATGGAGACAGACTCTCATCCA
GAACACCATCAGGACAGAGTTCAGCCTGACCATCATCACCATTGCACATAGACTGAACACAATCATGGACTATGATAGAA
TCATGGTACTGGATGCCGAATTGTGAAAAGAGCTTGACTACCAAGTGCATTATTAGCAAACACAGATTCTATTTTTACTCAA
TGGCAAAGGAAGCAAACTTGTCTGATTTTAAATTTTATTCTATGTGAATTTTTGTGAATTTTTTAAAAGATTTAAAAAAA
AAATCTTTAAAAGATCACAATTTGAAAAGCTATTTGATTGAGAGGAAAAGTTAAATGTATTTTATTGCTGCATATTACTTAGCC
CAACATTTAAAAACAATAAAGATACTCAAGCTTCATTTAAAAAAA

ORF

MDNFTLPILFDNSTAHFENSTLPVTTTHFENSTLPVTTTFENSTLPVTTTHFENFTTAAVLTLAGENITRPEKLCFADSIVDLDLLSSSW
PQLTSCFQDVTLYVFPFSLWLPFLFYMLASKRVSPLPISCLSIKMFLAASLSLITIIIEDASNDTGAHPISISHYVANGIRVISYAVVAI
VTQMERYKHTTSGFLFLWICLVCCDVPLYTKIIIEHEGSLRFLFVLYAMEVLQLLFNVSVDSTGEDSYLANSSPEVRASFPSRIFY
WWWTRTVYNGWRKDLQEEDFLVLPNRPDESNDLPLFDKLRNEWTRFRKRKRKEESYDKLGYRLSDLSKSYERHGRSPLMANMN
GKVTENGRYYTKVKMDSRNNKQPKPSSLRVLQMVGLKLCFGLVQKMSVDIFLMISPVLSSLIYADHADVDVFWKGYAIAVLLF
ITQMIKSVLNFNFWMSQVGMQMKTTLIAAIYKALTMNNEKSKESTAGEIVNLMVSDCQRVQDVMNFFFYAWTTPFQVIIAIAVLY
QYIGPSVFLAVLTTIPFNSYVASKQQQLQVKNLKHKDSRLRLTNEALCGMKVLKLYAWEPFFHEKISDIRSEETKVLHAIYLVNFISV
IFSAAPYLVMLATFAVYVSVSDENHLDANKAFVALSFFNLLRVPLGLSSIIISMVQAVVSIERINLFLCTGDLKTDNVIKDSRANFAIEVE
NGTFTWDKAAEPSLRNINLIPDGKLYAVVGPVGSKSSLVAALLGEMERLTGRASIKDNVAVVPQAWIQNATVKDNILFGKPFDKK
KYNKVISACALERDLLEISAGDMTEIGEKGINLSGGQKQVSLARAVYSGANIFIFDDPLSAVDTHVGKHIFNNVSHKGILKGRVLT
HGAWLPMVDSIIVLYDGEIREAGSYEDLMSHNGPFAEFIRTYLLQGDDNPESDSQEIQAIRTRIVNDVESATSDATSGDEGFTSSRL
ARRRRLSVTNESTMTSSLLMRSQTFIYEEDDKGDKNLGKLVQAEKLEKGVKLDVFWTYSKATGTFAIALSFIFALFQVANAWSNFW
LTDWTDGPELLANSSLIHTEEYTSRNNYYLWIFGVGIVQVGLVAHNIIYVVRMVAARKLHFGMLTSIFRSPMSFFDTPLGRIMNRF
SRDIEVVDNLLPIIRDYTLFICLVLTIISISTPLFLTLVPIIMILYLIQSFYVPTSRQLKRIESVTRSPIYTHFSETISGGATIRAYNAERFIK
ESKTRVDRNMSFYIIGLAANRWLGMNLELLANIIILGSAIFAVVTPGISGGDVGLSVSYAIQVSSNLVWVVRQMSDLETNIVSVERLKE
YSELESEAEWIVPHRRPVPGWPLDGKVKFSGYQTRYREGLDLVLKGITCEFKPGEKIGIVGRTGAGKSSLALALFRLEATEGSISVDGIRIS
DIGLHDVRSRLTLPQDPVLFGTLRMNLDPINEYNDHQLWDALTS AHLKDFVENLSEGLDYEVGEEGQSLVSGQRQLVCLARALLKKT
KILILDEATAAVDMETDLIQNTIRTEFSTCTIIAHRLNTIMDYDRIMVLDAGIVKELDSPSALLANTDSIFYSMMAKEANLV

C30981 – Hsp 16.6 (Hsp 12.2-like) (REV) MG262485

AACAAATATTGTTGATAATTTATCTAGATGACCTGCACAAATGAGCAAAATAGCAATTAATCCAAAAAATTAATACATTTT
AAAAAATCCACTTGATCTCATGTATCTGAGCACCCCAATTAATCCAAATGGAATATTTTGGGAATCAAATCACCAACATAAGC
TTTGTGATTTAGCTATTATCCATGTACCTATATATCCATAGGTATTTTAAATATCTTGGTAAATAGGACTTTTTACAGTTGAATGC

AGAGTCCCATTTTTCTTTTTCAACATGAACATATTATTAAGATAATTGAAGTTAATTCACATCTACTTTAATGTATGTTTCTGGGT
 AAGTAAAAAACAACAAAATCAGCATTGGCGAGCCTGTCTGTTTTA**GCTTTTGAAGTCTATTGGTATTGGAGTCTCCTTTGGC**
TCCTCAATGGCTTTCTTTGTATTTTGATACTCAGTACACCATTGGGCATTATTGATGAAGTAACTGATTTGGGATCAACATCCT
CTGGTAATTTGTACATCGGGTAATTTCTCTTCAACAAGCCATGGTTGTCTTCTCCTCATGCTTAGCCTGACAGTAAT
TTTTGATTATCAGATGATATTTTACTTCTCTGGTTTAAAAATGTTGAAATCCATGCGAATGCGCACTTCTTTATCTGTATTGT
GAACTCAGTTTCTCCATACTGACTCAGTGTCTGGGCAATGTTTTATCCAGAGCAATAAGTGGGTACCTAGCAAATTCATCAG
CAAACGCATCATTGGTGCCATTTCAAGAGTCTAGTACTATTGAAAACATTTTTAAGTCTTAACTTTTCAGCAAAGTTG
 TTGGATGTTGTTAACTGGACTCCACTGAAAGTGAGTGTGATGGAATCTGTTTTCTTAATAACTAGCCAGACCAAAGGACGTGCT
 TCATTTATATACTAACACTTCACTTCTAGAATTATCTAGTAGATTACTATCACACAGTGCAGAATGATTACTGTTTTTGTGTTG
 AATTTGGTTTTATTGCGAGTATGCGTAGATCTACTG

ORF

MFSIVPRLLNEMAPMMRFADDEFARYPLIALDKNIAQALSQYGETEVHNTDKEVRIRMDLQHFKEPEVKISSDNQKITVSAKHEEKQDN
 HGFVAREITRMYKLPEDVDPKSVTSSMNAHGVLISIKQKKAIEPKETQIPIDFKS

C31665 – cyp3A7 MG262486

ACTGGCAATGGCCAAAGCTGTGACTTTAAAAAGATCCTGTGACTCTCCACTCCATGAAACACGGTGTTAAAAACCACCGTTAAGA
 ACAGAACCTACTGAAGCGTGTGCGCTGAACAAAAGAAGCTTCGACAGAGGGTCCAACACAACATCACTTAGAATCTACAATAA
 ACCATAAAAAAA**ATGCTGACAACCTCTAGCAATAATTGCCGCCATATTGGCCCTCTGGCTTACATGTTTGTACGTTACATGTCAAG**
CCACACACAACACGTTTAAAAAGATGGGAATAGACAACCCCCCAACCCCATCATAGGGAACCTTTGGGAATGATTCAA
TATGGTATTTTTGAAGTACAGAAAGTTTTCTACAATCAATACATTGATAAAAAGGTATACGGATGGTACGACTCTAGAAGGCC
AACTATGATCGTCAAAGATCTTGATATGGTCAAAGATATATTTGTCAAAAATTTCAATTGTTTCGTTGATCGCCATTCTCTATTT
GAGGTTGATCCACCTTTTAGCGATAATCTGCTCAACCTAAAGGGCGAGCACTGGAACATGTCAGAAACATCGTGACCCCAAC
TTTCAGTTCAAGCAGACTCAAGAAAATGGCGCATCATATTGAAAGAAATACGAAGATAATGTTAGAAAATCTCCAGGCTCTAC
AAGAATCTGGCACAGAAGTTGAGGCTAGAGATTTTTATCTGCTTCACTCTTGACGTATTGCCAGCACTGGCTTTGGGTTAG
AGATTAACCACTCAAAAACCAACAATCCTTTGCAACTGAGGCCAAAAAGTAATTAATCAAAACCTCTACTGTTTAGTT
TAATATTACTGATTCCTCTCTAACCAATTTTTACGGCTTGGCCTCTCAATACTACCACAAAAATCCCTCAATATTTTCGTC
AAAGTTGTTGGAGGCGCAATAGAGGAAAGAGAGACGGATTAGAAGGGAAAGTCAACGATTTTCTAGATCTGTAAT
GAAACCGGAAAGAAAGAACCGGAGAACCTCAAAAGAAATGACAAGATCAGAACTTTATGGCCAACTCTAATTTTTATCTTTG
CCGGGTACGCACTGTTTCCACGGTATTGCTTACCTTGTCTTTCATCGCCATGCACCCAGACTGCTGCAACAGTGTGCGAGGA
AGAGATAGACGAAAAATGTGGTCAAACCTCACCAAAATACGATAACGTCCAGTTCGCTGGCATACTAGACATGTGCATCAACG
AATCGATTGACTGGCGCCACCAGCGTTTTAATCAACCGCTGTGTGAAGGATACGGAGGTCCAAGGTGTGAAGTTCCCT
AAGGACATGGTCTGTTGCCGCTCTACGCTATCCACACCGACCCGAAATCTGGCCGAAACCGGACAAATTTGACCCAAA
GAGATTTACGCCAGAAAACAAGAATCTCGCCATCCATATGCGCATCTTCTTTGCGCCAAGGGCCAAGAAATTTGATTGGCA
TGAGGCTGGCTCTCTGGAGATAAAAATAGCCTTAGCTACAATCTTTCAGAAGTTTACCCCAACACGCTGTAGTAAATCTGTG
ACCCGATCCAGCTGAGTAAATGGGAGTTAGAGCAAATGATGGCTTATGGATCAAGTTTCGCTGCCAGAAAATGAAATAAAAA
 CTAACGCTTTTTTTGACTGATGAAAAAGCATCAGTTTTGACGGATGTA AAAACGTCGGTTTTACCGATGTAATACATCAGTTTT
 GACTGATGTA AACATCACTTTTACTGAGGTA AAAACATCAGTTTAGACTGATGTTTTACAGATGATTTCTTAAAAATCAGATTT
 CTTTTTTACGATTACTTAAATTAATTTTTGTGATATGTTGCAGTAGTAGTTTTATAAAAATGTTTAAATTACTCGAGTAGTTTT
 ATTTGACTATAGTTAATTTAGTAGTATGATTTCTGCTCATCAAATACGTTAGGCAACAACACGATAACAAGTTTATACTGTAAA
 ACTGAAAATAAATATTTATAGCTTTAAAATGTAATTTCTTACAAAATATCCCTAGGTTTTAGAGTGTCAAATATATGTACATTAGATG
 ATTTTACTTTCTTCTCAGCACGTTAGCAAAAAGTTGGTGTACCAAATGGGTTGCGATGCTTGTATGGTGATTGCTACTAGACAAAA
 CATCATTGTTACTGTAGTGTCTCCACGTGTATAAGTACCAAATGGAATGTAGAATGTATGTTGGTATGGGATGTGTACCAT
 GTAGAATGTATGTTGTTATGGGATGTGTACCATTTAATACGACAACCCCTAAGTACTGTAACAATCAACGTTGGCTGTG
 CATGGCAACTACTTCATAACTGTTAGCTCGTCTTACTTTAGCCCTGTCATCACATCATTATGATCTGTTACCAGCTGTTGGATA
 TATGAATGATGTTATACACAGTAATATGCGGCGTATCTAACACTGTAAACATCTTTATAAAGTTAAATGCACGAGTTGAGGTCC
 CAGGCTGGGCGGCTGGCAACTTTAGTCAACAATCTGTTGCTATCTGCCTAAAGAGCGTTGTCAAACCGCTATGCTCGCAGG
 AGAGCTATTCTATTTGCTATTCAGTATTGAAAGAGTTGATAGGTTTTAGCTTTTTGTAACCCGATAATCTAATAATTTCTTTCTA
 TACCATGATTAACAATGGCACATAGTGAGTGTGTAATGCACCTATTTACAACATTTTTAGGCTATTATTGAATGAATACAGAA
 CAAAAATGATTACATAATGTAATGATAATGTAATCAGAACCTTTATATTTACTGTTGATTTTTATATGTTAAACCATTTCTGCTTT
 GCTAAAGGATTAAGTTGTTTCAATTA AAAAAAAAAA

ORF

MLTLTIAIAAILALLAYMFVRYMSATHNTFKKMGIDNPPNPIIGNFGNVFKYGFVEVQKVFYNQYIDKKVYGWYDSRRPTMIVKDLD
MVKDI FVKNFNCVDRHSLFEVDPFSDNLLNLKGEHWKHVRNIVTPTFSSRLKMAHHIERNTKIMLENLQALQESGTEVEARDFLS
AFTLDVIAS TGFGLEINTLKNPNPFATEAKKVINPNLLFSLILLIPSLKLFSLRGLSILPQKSLQYFVKVVEAAIEERKRDGLEGKVNDFLD
LVMNAEKETGEPHKELRSELYGQALIFIFAGYDVTVLSFTLFFIAMHPDCCKRVQEEIDEKCGQTSPNYDNVQSLAYLDMCINESIRL
APP AFLINRVCVKDTEVQGVKFKPDMVVAVPVYAIHTDPEIWWPEPDKFDPKRFTPENKESRHPYAHLPFGQGPRNCIGMRLALLEIKIA
LATIFQKFTPTRCSKSVYIQLSKMGVRANDGLWIKFAARK

Contig1523 – Caspase 3 –like

ACGGAAGTTACAATGAATCCTAAATCTTGTTACTAGAACAGTTCTAATCTAATATTATGCTACGGCAGTAGTGAAGTGCAAC
TAGTAGAGACCAAGACATCTAGATCTAGCTTACTAGCTATTAATTTGAGTTAAATTATAAAATTTGTAACGGCAATATATTATTATT
AGGCTCCATGGATCACATAGATGCAATGCCTGCAGGCCAGGGGGATGTGGCTCTACTGGTGAAGAGATTGAGTTGATGC
TAAAGGGGAACCAAGCCAGTCACAACAGGCCAGATAAATTTGACTGAGAGAGAATTTCTGTCTGACTCCTATAAAATGGACT
ACCCAAAAGAGGAACGGCAGTTATAATCAACAACAAAAGTTTACCCCAAGAACAGGTATGGGTGAGAGAACCCGGAACAG
ACGTAGATGCTGACAGCATGTATGGACTACTGGACAAAATGGGTTTTGAGAAAATCTTTTGTGATAATAATTTAACTGCAAGG
GAAATGGTTAAGCAGCTCCAAGAGGTTGCAAGACAAGATCACAAGACAGCAGCTGTTTTGTCTGTGTAATTTCAACCCATGG
AGAGGAAGGTTATGTTTTGGGACAGATGACAAGGTGCCAATTGATGATTTGGTTGCTCCATTCAAGGGACATAACTGCAAGT
CTCTGTCTGTAACCCAAAATTTTTTAATCAAGCTTGCAGAGGCAGTGAACCTGATTCTGGTATTGAAGTTGCAGATGCCA
GTGAGATGGAGGTAGAAATGGAGGAAGATGAAACCATTGTTAGGAGAATCCCACTGAGGCAGATTTCTGTATGGCATATTC
AGTTGTTCCAGGATACTTTGCTGGCGTAATTCAGCTAGAGGCTCATGGTTTATTCAAGCAATTGTGGATGTGTTCACTAAGTA
CTGGGATAAGCTGGACCTCTCACCTGATGACCAGGGTCAACAAGAAAGTGGCTTATGACTTTGAGTCCAATGCAAGTAGAG
AGTACATGAACAGGAAGAACAATTTCTGTATAACTTCAATGTTGACTAAAGATGTTTACTTTAAAAAGAAAATAAATAACT
AGCAAAACAAAACATTATTGTACATTTTTGGTTTAAATTAATATGAAGTTTCATAAAAAAAGAAAATAGATAACTTAACAAAAC
ATTATAGTAAATTTTTGTTTTAAATTAACATGAATGTTGATTAATAAAGTGATTAGTTGAACATTTTTACTCTATTTTTTTAA
CACGCTGATAGACATTTTTTACGCTTGTAAAAGATCCAGTACCTCTCAAGTATTTGTTGATGCTGCCAGATATATTGATGTTA
TTACATATCATCAAAATTTGTGCAAATTAACAAATGGCAACAACACCTCTACTGCACAAGTGGTTGAGAGAAAGATAGCTTT
GTGTGTGTGTACTGAATTTACAAAATAGTCTTTTTGTTTTATGATTAATTAATAAAGTGCCTTAACAGTAACACTATAATCAT
TACCATTGTGTGATTAATAAATATGATTATCATTGTTTTGTTTTACTTTCTGTCAATTCATTACTTATTGTATAATATGTAC
ACTCTATAATTTTTAAAATCAAAGTTGAATAACTGTGTGTAATAATGATAATAACAATTTGATGATTTAGTGAACGGCCTAC
TGTTGATAGCTTTTTAAAAGTTAGCTGAATTAAGTATGGTTTTGTTAGGAAAAAATGTGTTCTATTTTTCCCTTGGGTTTTT
TTGTAATCTGTTGATGTGCTTGAATACATTTTGTGACTTCTGTTTATCTTAGCATTGAAAATGGCTTTATCTTTAGTTATG
AATTAGTGTCTTTCTATGTATGTTACATTTAGTTTTAAGCAAGGATACCATAGAACTTTATAAAAAAGTTTTTGAATGCATTTT
TAAAAATATAAGCATTATTTAGCAACATTAATTTATTTAAACAAGGTTTTATTTAGTGGTTAATTGTTTTGATAGTTTCAATA
GGTTTATCATTGTGAAGAACATACATTTATGTTTATGATTCTGTTTGTATGCATAAAGTAATTTGAAGCCATGACATATAACTAAAC
TAGTAAAGACCAGTAAAAAACATTTGTTCACTATTGAGGCATAATATACAACATTAGCCTACAGTGGAGACTACGCCAACAGAT
GAGGAGACTCAATACATAGTACAGACTCTGTACTAGTACATCTACTGTTCTAGATCTCACTAC

ORF

MDHIDAMPAGQGVDVAPTGGDRSDVDAKGEPSQSQPGQINLTEREFLSDSYKMDYPKRGTAVIINNKKFHPRTGMGERTGTDVDADS
MYGLLDKMGFEKIFCHNNLTAREMVKQLQEVARQDHDSSCFVCVILTHGEEGYVFGTDDKVPIDDLVAPFKGHNCKSLAAKPKIFFN
QACRGTELD SGIEVADASEMEVEDETVRRIPT EADFLMAYSVVPGYFAWRNSARGSWFIQAIVDVFTKYWDKLDLLMLTRVN
KKVAYDFESNASREYMNRRKKQIPICITSMMLTKDVFYFKK

Contig3836 – Estrogen receptor

CTAGATGCACTACTGTGCATGCTGTGTGCCCTGCCTCCATGTTCCATTAGCATGCTCAATGCGACCGTCTTGTGTAGTGTGTTCC
CGTCCGTTACTATTTAGTTATCAGTGCCCTCCCCTGCATGACCAGACACCGACTGGGACTGGGTCTGTAGGCCACTTCGCTC
GGGAGGGGAGGGGCACATCAAAGCGACACACTCACGCATGCTTGTGTTATCATTTCGAGGATTAGCGCTTAAACAGTATCTC
ACTCGTTTGTGCTGGCCAGTGGTCATGGATGGCTAGACTGTGTTTACACCTTTTTCATGTCACATCAAGACTTGAGTGAAGCA
CTGACTGCAAGTCTCTAAGGTTGAGAGGTGCGGGGAGGGCGGATGGTTTTCTCCAGTTTATGATGCAAGTCTGCCCTT
AGGATGTTCTGGGGAAGTTCTACAGGCAGCCACTCAACCACCTTGAGAGCTTCTCATGGATGGGCCAGCCACCCCTGC
ACATGAAGCAGGAGATGGGGCTGCTGTTTCAAGGAAGTCAAGCAAGCTATGCCAGGTGTGTAATGACAACGCTTCAGGCTT
CCACTATGGCGTCTGGTCTGTGAGGGATGCAAGGCTTTCTCAAGAGAAGTATACAAGTCCAGTGGACTACATCTGCCAG
CTACAAACACTGTACTATAGATAAACACAGACGGAAGCTGCAAGCATGTGGCTTCAAGATGTTATGAAGTTGGAT

GAACAAAGGAAGTCAAAGAAAGGAAAGGAAGAGCAGTGCTAATGGTGCAGGTCTCAAAGGCAAGAGGTGCAGGGCTGACT
 CTTCTGACTCATCCATCAACTCCACAAACAGCGCTGCCTGCTCCTCTAAAGCAGGCAAAAGGTCAGAAAGTGCATCAATCCTTG
 AGGCCCTGCAGAAGGCTGACCTTCTGTACTAGAGAGCTACCACAACCACAGCCTCCAGCCACACGTGTCCACTTGTCTCAACA
 CTTTGATTAAGTTAGCCGACAGGGAGCTGCTACTGATTAATTGGGCCAAACATGTGCCAGGTTATACCTGTCTGACCCTAA
 GTGACCAGGTGCACCTAATAGAGTGTGCTGGATGGAACCTTTGCTGCTCAACTGTGCGTTTAGGTTCTATGGAACATGAAGGC
 AGGACGCTGGTTTTGCACCTGACTTTCATCTAGACAGACACCAAGTGGTCAAGTCACTGGGATGGGAGACGTGCTGGAACAGG
 TGGTGTCTGTCTCAGAACAGATGGTGTGTCATAGTCTCAACAAGGAGGAAGTGTGCTACTTCAAGCTACAGTCTTGTTAAT
 GCAGAAGTACGACGCTTGGATAGCTTTACCAAACCTCAAGAGATGCGGCAAGTTATTCTGGACGTCTTCATGGAAGTTGGTGG
 CCGGCACCAAGGCTATGGCAGTTGGGCCACGCCCTTCCATTCTGCTGCTGCTGACCCACATCAGGCAAGCAGGGGAGCGGG
 GAATCACTTACTTCCAGCGCCTCAAGATGGAAGGGTGCCTACATTCTGCGACTTGTGACAGAAATGCTGGATGCCACAAT
 TCTTCCGGTGAAAGACGACGACTTCAACAGCAACAACATCAACAACATCAACATCACCCATCACAGCACCCTCATCACCCAT
 CCCTCACAGCACCAATGGCGCCAGAA

ORF

MARLCLHLFMSHQDLSEAPDCKSPKVERCGEGRMVSPSSCMQVLPGLGCSGEVLQAASTTTPESFLMDGPSPLHMKQEMGAASVSG
 SQAQLCQVCNDNASGFHYGVWSECGKAFKRSIQGPVDYICPATNTCTIDKRRKSCQACRLRRCYEVGMNKGSRKERRKSSANGA
 GLKGRKRADSSDSSINSTNSAACSSKAGKRSASILEALQKADLPVLESYHNHSLPATRVHLNLIKLADRELVYLNWAKHVPGYTC
 LTLSDQVHLIECCWMELLLLNCAFRSMHEGRTLVPFAPDFHLDRHQVSVTGMGDVLEQVAVSEQMVLHSLNKELELLQATVLVN
 AEVRRDLSFTKLQEMRQVILDVFMVEVGRHQYGSWRHAPSILLLTHIRQAGERGITYFQRLKMEGCVTFCDLLEMLDAHNSGSE
 RRRLQQQHQHQHHPHQHSSHPHQHMAPE

Contig13629 – Cu-Zn Superoxide Dismutase

GGTTCGGCAAAGATAGCGTCAAACAACAACTATATAAAAAGTGCATGGTCACCGTGGGTCACAGTGATTACAATACATTTA
 GTAATAATTCTCGTATGTTATTGATGCTGAAGAGTCTTCATTAATTAAGTCTGAATATGGTTAAAGCAGTTTGTGTTGAGTC
 CTGGCTCTGCACAAGGCATTACAGGCACCATCACATTTACGCAAGAGAAAAGCTGGTGTGCAACTATTGTGAGTGGTCAAGTG
 AAAGGACTAGCTCCTGAAAATCATGGGTTTCATATTCACCAAGTTTGGTACTATACTAATGGATGCATAAGTGCTGGAGGCCA
 CTTAATCCTTGCAATAAAAATCACGGAGGTCAGCTGATCAAGAGAGGCATGCTGGAGATTTGGGCAACATAGTAGCTGGA
 GACGATGGCACAGCTACTATTGACATTAAGACACTCAAATCCCCTCATTGGAGAACATTCTATCATTGGGAGAAGCTTGGT
 GGTGCACGAGAAAAGAAGATGACTTGGGCAAAGGAGGCAATGAGGAAAAGTTAAAGACAGGAAACGCCGGTCTCGTCTGGC
 CTGTTGGTGTATTGGTGTGACAGCGTAATAGAAAATTTCTATTGGACGATGTGACAAAAGGAGAGGGGTGTTTGTGATAGAT
 TGGGCATCTTCTATCTGTGTGAACATTGAGTTATTGGTTAAGCTCAATGTAATGTCAAACCAGCTTCAAACAACCAAGTGGCT
 GACTGGTTCATAGTAGATAGATCTAAATATACCGTAGAGA

ORF

MVKAVCVLSPGSAQGITGTTFTQEKAGAATIVSQVKGLAPGNHGFHIIHQFDYTNCGISAGGFHPCNKNHGGPADQERHAGDL
 GNIVAGDDGTATIDIKDTQIPLIGEHSIIGRSLVHEKEDDLGKGGNEESLKTGNAGPRLACGVIGVTA

Contig22373 – Heat shock protein 90

ATATTTTACGCTAGTCAACCACGCCATTCTAAGAAATTTCACTGACGCCGGGTTGAAATACTAATTGCAAGTGTACAGGTAGA
 CCACAAGATCTACCCTAAGAGAGATAAACCATGCTGAAATAAATCCTGCTGAAGATATGGAGGGGGAAAAGGAAACCTTCG
 CTTTCAAGCTGAGATTGCACAGCTGATGAGTCTTATCATCAATACGTTCTACAGCAACAAAGAAATTTTCTCAGAGAGCTGA
 TTTCAAATGCTTCTGATGCTTTAGATAAAATTCGATATGAATCTTAACTGACCCTAGCAAGCTTGATTCAGGAAAAGATCTTCA
 CATTAGAATAATACCTGACAAAGAGAACAAAACCTAACTCTTGAGGACTGGTATTGGTATGACAAAAGGCAGACCTGGTG
 AACAACTGGGAACAATTGCAAAGTCTGGAACCAAGGCTTTTATGGAGGCTGCAAGCTGGGGCAGACATTTCTATGATTGG
 ACAGTTTGGTGTGGGCTTTACTCAGCCTATCTGTTGCTGATCGAGTGGTGTGACTCAAAGCACAAATGATGATGAGCAATA
 TACTTGGGAGTATCAGCTGGTGGGCTTTCACTGTTGCTTCATCACGATCAGCACCATTGTCAAGAGGCACAAGAATTACCTT
 GCACATGAAAGAAGATCAGCTTGAATACCTTGAGGAAAAGAAAATAAAGATGTTATTAAGCAAGCAGCCAGTTTATTGGT
 TACCAATTAACCTATTGGTAGAGAAAGAGCGTGACAAGGAGGTTTCTGATGATGAAGAGGAAGAGAAGAAAGAAGATGAT

GCAGATGAGAAAAAGATGAAGATAAACCAAAGTTGAAGATCTTGATGATAATGAGGAAGATGCAGATGTAAAAGACAA
GAAAAAGAAAAAGAAGATTAAGAAAAGTACAACGAAGAAGAAGATTGAACAAAACGAAGCCACTGTGGACCAGAAAAC
CTGATGATATTACTCAAGAGGAATATGCAGAGTTCTACAAATCTCCACCAATGACTGGGAAGACCATCTGGCAGTGAAACAC
TTTTCAGTTGAAGTCAATTGGAATTCAGGGCTCTTTATTCATTCCAAGCGGGCTCCATTTGATATGTTTGAAAAAAGAAG
AAAAAGAACAATTAAGTTGTATGTCGTAGAGTTTTTATCATGGACAATTGTGAAGATTTGATTCCAGAATACTTAAATTTT
GTCAAAGGTGTTGTAGATTGAGAAGACTTGCCTCTAACATATCAAGAGAAATGCTACAACAAAGTAAAATTCTGAAAGTGAT
TAGGAAAAACCTAGTCAAAAAGTGCATTGAACTATTGAGGACTTACTGAGGATAAAGAGAACTACAAAAAGTTCTTTGAG
CAGTTTTCCAAGAATCTAAAGTTGGGAATCCATGAAGACAGTACGAACAGGAAGAAATTGGCAGATTTCTTGAGGTA
CATCTCAGTCTGGTGATGAGTTGACATCATTGAAAGATTATGTATCAAGAATGAAAGAGAACCAGAAAGATATCTATTACATT
ACAGGTGAAACAAAAGAGTCTGTTGAGAAATTCAGCTTTTGTGAAAGAGTTAAGAAGAGAGGATATGAGGTGATTTACATGA
TAGATCCCATTGATGAGTACTCAGTTCAGCAGCTGAAAGAGTATGAGGGCAAGAATTTAGTTTGTGCTACTAAAGAAGGCCTT
GAACTGCCAGAAGATGAGGCTGAGAAGAAGCGCTTGGAGGAAGCTAAAGCTCAATTTGAGGGACTCTGTAAGTAATGAAG
GAAATCTTGGACAAAAAGTAGAAAAGGTGGTTGATCAAATAGGCTAGTGACATCTCCATGCTGATTGTACATCTCAGTA
TGGCTGGTCAGCAAACTGGAGAGAATAATGAAAGCACAAGCTCTGAGAGACACAAGCACTATGGGCTATATGGCAGCCAA
AAAACACCTAGAGATCAACCCAGACCCTCTATAGTCAAACCTCTAAAGGAGAAGGCTGATGCTGATAAAAATGATAAAGCA
GTGAAAGACCTTTGCTCCTCTGTTTGAACCTCTCTTTTAGCATCTGGCTTTAGTCTTGAGGACCAACCTCACATGCAAAACA
GGATTACAGAATGATTAAGTTGGGATTGGGTATTGATGAGGATGATACTACAGCCACTGAGACACCTAGTTCTGAAGGTGC
AAGTGCTGAAGAGATGCCACCACTGGAAGGAGATGAGGATGATGCATCACGTATGGAGGAAGTGGATTAAATTGACTATACT
ATTTGAAGTTTTGGTTTACGTGACCAATAATTTAGCCTCTAGTTCATTTTTTTTTTTCATTCCATCATTGTAGCTTTTCATCGCCTATT
TATAGATATTGCTGAATCAAACCTTGATCCTCGAATATTTGACTACTGCCATGTCATTTGTTGTCTAATTTTTTAAAGTTGAAATAA
AAGGTTGAAAATTTGAGTT

ORF

MPEINPAEDMEGEKETFAFQAEIAQLMSLIINTFYSNKEIFRELISNASDALDKIRYESLTDPSKLDGKDLHIRIIPDKENKTLTLEDTGIG
MTKADLVNNGTIAKSGTKAFMEALQAGADISMIGQFVGFYSAYLVADRVVVDSKHNDDEQYTWESSAGGSFTVASSRSAPLSRGT
RITLHMKEQLEYLEEKIKDVIKKHSQFIGYPIKLLVEKERDKEVSDDEEEKKEDDAEKKDEKPKVEDLDDNEEDADVKKKKKKKI
KEYNEEEELNKTPLWTRNSDDITQEYAEFYKSLTNDWEDHLAVKHFSVEGQLEFRALLFIPKRAPFDMFENKKKKNNIKLYVRRVFI
MDNCEDLIPEYLNFKVGVVDSDELPLNISREMLQSKILKIRKLVKCCIELIEDLTEDKENYKFFEQFSKLNKLGIHEDSTNRKKLADF
LRYTTSQSGDELTSKDYVSRMKNQKDIYYITGETKESVQNSAFVERVKKRGYEVYIMIDPIDEYSVQQLKEYEGKNLVCVTKGLELPE
DEAEKKRLEEAKAQFEGLCVKMEILDKKVEKVVVSNRNVTSPPCIVTSQYGWSANMERIMKAQALRDTSTMGYMAAKKHLEINPDH
PIVKTLKEKADADKNDKAVKDLCLLLFETSLLASGFSLEDPTSHANRIHRMIKLGIDEDTTATETPSEGASAEEMPPLEGDEDDASR
MEEVD

ANEXO III

Otros artículos científicos publicados durante el desarrollo de la tesis:

- **Aquilino, M.**, Martínez-Guitarte, J.L., García, P., Beltrán, E.M., Fernández, C., Sánchez-Argüello, P., [2018]. Combining the assessment of apical endpoints and gene expression in the freshwater snail *Physa acuta* after exposure to reclaimed water. *Science of The Total Environment* 642: 180-189.
- Herrero, O., **Aquilino, M.**, Sánchez-Argüello, P., Planelló, R., [2018]. The BPA-substitute bisphenol S alters the transcription of genes related to endocrine, stress response and biotransformation pathways in the aquatic midge *Chironomus riparius* [Diptera, Chironomidae]. *PLoS ONE* 13[2]: e0193386. doi:10.1371/journal.pone.0193387.
- Martín-Folgar, R., **Aquilino, M.**, Ozáez, I., Martínez-Guitarte, J.L., [2018]. Ultraviolet filters and heat shock proteins: effects in *Chironomus riparius* by benzophenone-3 and 4-methylbenzylidene camphor. *Environmental Science and Pollution Research* 25[1]:333-344. doi: 10.1007/s11356-017-0416-1.
- Ozáez, I., **Aquilino, M.**, Morcillo, G., Martínez-Guitarte, J.L., [2016]. UV filters induce transcriptional changes of different hormonal receptors in *Chironomus riparius* embryos and larvae. *Environmental Pollution* 214:239-247. doi: 10.1016/j.envpol.2016.04.023.



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Combining the assessment of apical endpoints and gene expression in the freshwater snail *Physa acuta* after exposure to reclaimed water

Mónica Aquilino^a, Jose Luis Martínez-Guitarte^a, Pilar García^b, Eulalia Maria Beltrán^b, Carlos Fernández^b, Paloma Sánchez-Argüello^{b,*}

^a Grupo de Biología y Toxicología Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain

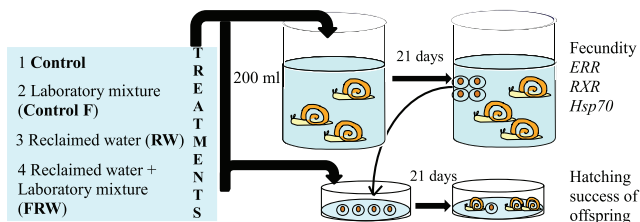
^b Laboratorio de Ecotoxicología, Departamento de Medio Ambiente, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Crta A Coruña Km 7, 28040 Madrid, Spain



HIGHLIGHTS

- Effects of reclaimed water were tested at different biological organisations levels.
- Adding a laboratory mixture was tested in both test medium and reclaimed water.
- Reclaimed water reduced fecundity, but not the hatching success of offspring.
- Fecundity correlated significantly with *RXR* expression.
- Fortifying reclaimed water by adding the laboratory mixture enhanced embryotoxicity.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 April 2018
 Received in revised form 5 June 2018
 Accepted 5 June 2018
 Available online 9 June 2018

Editor: D. Barcelo

Keywords:

Reproductive success
 Emerging pollutants
ERR
RXR and *Hsp70*

ABSTRACT

Post-treatment wastewater reuses are diverse. Recreational and environmental restoration uses of reclaimed water (RW) can be potentially harmful to aquatic organisms. In this work the freshwater snail *Physa acuta* was exposed to RW (100%) and its dilution (RW 50%). A simple laboratory mixture of three emerging pollutants was used to address the complex problem of mixture toxicity of RW. Hence fortified reclaimed water (FRW), obtained by adding fluoxetine (400 µg FLX/L), perfluorooctane sulphonic acid (90 µg PFOS/L) and methylparaben (9 µg MP/L), was tested at two dilution percentages: 100% and 50%. The effects of the laboratory mixture of FLX, PFOS and MP on the test medium were also studied. Long-lasting effects, together with early molecular responses, were assessed. Fecundity (cumulative egg production) over 21 days and the hatching of produced eggs (F1) after another 21-day embryonic exposure were monitored. The gene expression of three genes was analysed after 24 h of exposure: two endocrine-related nuclear receptors (*ERR* and *RXR*) and one stress protein gene (*Hsp70*). This reproduction test, with additional assessments of the F1 recovered eggs' hatching success, showed that both RW and FRW significantly reduced fecundity. F1 hatching was affected only by FRW. The gene expression results showed that the *RXR* response was strikingly similar to the fecundity response, which suggests that this nuclear receptor is involved in the reproductive pathways of gastropods. *ERR* remained virtually unaltered. *Hsp70* was overexpressed by the laboratory mixture in the test medium, but no effect was observed in the fortification of RW. This opposite effect and lack of response for F1 hatching produced by the laboratory mixture in the test medium highlighted the difficulty of predicting mixture effects. The experimental approach allowed us to test the effects caused by RW on *P. acuta* at different biological organisation levels. Thus, the combination of molecular biomarkers and ecological relevant endpoints is a good strategy to test complex

* Corresponding author.

E-mail address: arguello@inia.es (P. Sánchez-Argüello).

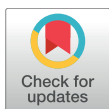
RESEARCH ARTICLE

The BPA-substitute bisphenol S alters the transcription of genes related to endocrine, stress response and biotransformation pathways in the aquatic midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae)

Óscar Herrero^{1*}, Mónica Aquilino¹, Paloma Sánchez-Argüello², Rosario Planelló¹

1 Grupo de Biología y Toxicología Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, UNED, Madrid, Spain, **2** Laboratorio de Ecotoxicología, Departamento de Medio Ambiente, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, INIA, Madrid, Spain

* oscar.herrero@ccia.uned.es



OPEN ACCESS

Citation: Herrero Ó, Aquilino M, Sánchez-Argüello P, Planelló R (2018) The BPA-substitute bisphenol S alters the transcription of genes related to endocrine, stress response and biotransformation pathways in the aquatic midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). PLoS ONE 13(2): e0193387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193387>

Editor: Cheryl S. Rosenfeld, University of Missouri Columbia, UNITED STATES

Received: October 31, 2017

Accepted: February 11, 2018

Published: February 21, 2018

Copyright: © 2018 Herrero et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This research was supported by Ministerio de Economía y Competitividad (Spain) contract grant number CTM2015-64913-R (<http://www.idi.mineco.gob.es>). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Bisphenol S (BPS) is an industrial alternative to the endocrine disruptor bisphenol A (BPA), and can be found in many products labeled “BPA-free”. Its use has grown in recent years, and presently it is considered a ubiquitous emerging pollutant. To date there is a lack of information on the effects of BPS on invertebrates, although they represent more than 95% of known species in the animal kingdom and are crucial for the structure and proper function of ecosystems. In this study, real-time RT-PCR was used to determine the early detrimental effects of BPS on the transcriptional rate of genes in the model species *Chironomus riparius*, specifically those related to the ecdysone pathway (*Ecr*, *ERR*, *E74*, *Vtg*, *cyp18a1*) crucial for insect development and metamorphosis, stress and biotransformation mechanisms (*hsp70*, *hsp40*, *cyp4g*, *GPx*, *GSTd3*) that regulate adaptive responses and determine survival, and ribosome biogenesis (*its2*, *rpL4*, *rpL13*) which is essential for protein synthesis and homeostasis. While 24-hour exposure to 0.5, 5, 50, and 500 µg/L BPS had no effect on larval survival, almost all the studied genes were upregulated following a non-monotonic dose-response curve. Genes with the greatest increases in transcriptional activity (fold change relative to control) were *Ecr* (3.8), *ERR* (2), *E74* (2.4), *cyp18a1* (2.5), *hsp70* (1.7), *hsp40* (2.5), *cyp4g* (6.4), *GPx* (1.8), and *GST* (2.1), while others including *Vtg*, *GAPDH*, and selected ribosomal genes remained stable. We also measured the transcriptional activity of these genes 24 hours after BPS withdrawal and a general downregulation compared to controls was observed, though not significant in most cases. Our findings showed that BPS exposure altered the transcriptional profile of these genes, which may have consequences for the hormone system and several metabolic pathways. Although further research is needed to elucidate its mode of action, these results raise new concerns about the safety of BPA alternatives.

RESEARCH ARTICLE

Ultraviolet filters and heat shock proteins: effects in *Chironomus riparius* by benzophenone-3 and 4-methylbenzylidene camphor

Raquel Martín-Folgar¹ · Mónica Aquilino¹ · Irene Ozáez¹ · José-Luis Martínez-Guitarte¹ Received: 9 July 2017 / Accepted: 3 October 2017 / Published online: 16 October 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract Benzophenone-3 (BP3) and 4-methylbenzylidene camphor (4MBC) are common ultraviolet filters (UV filters), compounds considered as emergent contaminants, used in different products like plastics and personal care products. The levels of these compounds are rising in the wild, but the effects they have on invertebrates are poorly understood. *Chironomus riparius* is a benthic insect widely used in toxicology, and several studies have been previously performed in our laboratory to determine the effects these compounds have on this organism at the molecular level. We have shown that UV filters can alter the mRNA levels of heat shock protein 70 (Hsp70), one of the most studied heat shock proteins. Although these proteins are crucial for the survival of organisms, little data is available on the effects these emergent contaminants have on them, especially in invertebrates. Here, we analyzed the transcriptional activity of 12 genes covering the different groups of heat shock protein [*Hsp10*, *Hsp17*, *Hsp21*, *Hsp22*, *Hsp23*, *Hsp24*, *Hsp27*, *Hsp34*, *Hsp40*, *Hsp60*, *Hsc70* (3), and *Hsc70* (4)] in response to 0.1 and 1 mg/L concentrations of BP3 and 4MBC at 8 and 24 h. The results showed that some small Hsp (sHsp) genes were altered by these compounds, while the genes of proteins present in mitochondria,

Hsp10 and Hsp60, did not change. sHsps are also involved in developmental processes, so the observed variations could be due to the endocrine disruption activity described for these compounds rather than to a stress response.

Keywords Ultraviolet filters · *Chironomus riparius* · Stress response · Small heat shock proteins

Introduction

Water pollution is one of the main concerns that the environment faces today. A great diversity of compounds reaches streams, lakes, and sea without clear knowledge of their effects on biota, especially invertebrates. Among these compounds are ultraviolet (UV) filters, substances used to prevent damage produced by UV radiation in a wide variety of industrial and personal care products. They are regulated and must be declared in cosmetics, but they remain essentially unidentified in technical products (Regulation (EC) No. 1223/2009). They have been detected in aquatic environmental samples (Brauch and Rand 2011; Fent et al. 2010; Grabicova et al. 2013; Sánchez-Quiles and Tovar-Sánchez 2015; Tarazona et al. 2010), tap water, and treated sewage sludge (Díaz-Cruz et al. 2012; Gago-Ferrero et al. 2011). Because of their high lipophilicity, UV filters bioaccumulate in aquatic organisms (Gago-Ferrero et al. 2012, 2015) being detected in biota like marine mammals, fishes, birds, and macroinvertebrates (Balmer et al. 2005; Buser et al. 2006; Calafat et al. 2008; Gago-Ferrero et al. 2013; Sieratowicz et al. 2011). In humans, they have been detected in urine and blood samples (Zhang et al. 2013), indicating that they are also a risk for human health. 4-Methylbenzylidene camphor

Responsible editor: Philippe Garrigues

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11356-017-0416-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ José-Luis Martínez-Guitarte
jlmartinez@ccia.uned.es

¹ Grupo de Biología y Toxicología Ambiental, Departamento de Física Matemática y de Fluidos, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, UNED, Paseo de la Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

UV filters induce transcriptional changes of different hormonal receptors in *Chironomus riparius* embryos and larvae[☆]

Irene Ozáez, Mónica Aquilino, Gloria Morcillo, José-Luis Martínez-Guitarte^{*}

Grupo de Biología y Toxicología Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia, UNED, Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2016

Received in revised form

30 March 2016

Accepted 7 April 2016

Available online 17 April 2016

Keywords:

UV-filters

Hormonal receptor 38

Methoprene-tolerant

MAPR

Insulin-like receptor

ABSTRACT

Organic ultraviolet (UV) filters are emerging contaminants that are ubiquitous in fresh and marine aquatic systems due to their extensive use in cosmetics, plastics, paints, textiles, and many other industrial products. The estrogenic effects of organic UV filters have been long demonstrated in vertebrates, and other hormonal activities may be altered, according to more recent reports. The impact of UV filters on the endocrine system of invertebrates is largely unknown. We have previously reported that some UV filters may affect ecdysone-related genes in the aquatic insect *Chironomus riparius*, an ecotoxicologically important model organism. To further analyze other possible effects on endocrine pathways, we first characterized four pivotal genes related with hormonal pathways in insects; thereafter, these genes were assessed for alterations in transcriptional activity after exposure to 4-methylbenzylidene camphor (4MBC) or benzophenone-3 (BP-3), two extensively used sunscreens. We found that both chemicals disturbed the expression of all four genes analyzed: hormonal receptor 38 (*HR38*), methoprene-tolerant (*Met*), membrane-associate progesterone receptor (*MAPR*) and insulin-like receptor (*INSR*), measured by changes in mRNA levels by real-time PCR. An upregulatory effect at the genomic level was detected in different developmental stages. Interestingly, embryos appeared to be more sensitive to the action of the UV filters than larvae. Our results suggest that the risk of disruption through different endocrine routes is not negligible, considering the significant effects of UV filters on key hormonal receptor and regulatory genes. Further effort is needed to develop environmental risk assessment studies on these pollutants, particularly for aquatic invertebrate model organisms.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

UV (ultraviolet) filters are commonly used as additives in plastics, textiles, food packaging, and personal care products to prevent damage caused by UV radiation. In recent decades, the production of cosmetics with UV filters has increased due their ability to protect human health. There is a wide range of compounds with UV filtering properties. The most frequently used are organic chemicals, such as benzophenones, camphors, and cinnamates (Manová et al., 2013; Rastogi, 2002; Sambandan and Ratner, 2011). Due to the growing use of cosmetics with sunscreen agents in recreational waters, high concentrations of UV filters are released into the ecosystem, and their levels in aquatic ecosystems are similar to those of other well-

known contaminants. UV filters have been detected in ubiquitous water samples and biota at concentrations that may have a potential negative impact on the environment (Brausch and Rand, 2011; Díaz-Cruz and Barceló, 2009; Ramos et al., 2015; Sánchez-Quiles and Tovar-Sánchez, 2015; Tsui et al., 2014).

Ecological risk assessment and environmental occurrence have been investigated in different aquatic habitats. Two of the most common UV filters are 4-methylbenzylidene camphor (4MBC) and benzophenone-3 (BP-3), which have been found in natural waters (lake water, river groundwater, and sea water), sediments, and even in tap water (Kim and Choi, 2014; Ramos et al., 2015). BP-3 has been detected in concentrations up to 125 ng/L and 993 ng/L in lakes and rivers, respectively. 4MBC has been found in concentrations ranging from 82 to 700 ng/L in lakes and rivers (Poiger et al., 2004; Román et al., 2011). High concentrations of these compounds have also been reported on Spanish beaches, up to 3316.7 and 1043.4 ng/L for BP-3 and 4MBC, respectively (Sánchez Rodríguez et al., 2015; Tarazona et al., 2010; Tovar-Sánchez et al., 2013).

[☆] This paper has been recommended for acceptance by von Hippel Frank A.

^{*} Corresponding author.

E-mail address: jlmartinez@ccia.uned.es (J.-L. Martínez-Guitarte).

La presente tesis doctoral se ha llevado a cabo gracias a un contrato predoctoral [BES-2013-064041] y una ayuda a la movilidad [MINECO EEBB-C-16-00764] financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad.

