

Evaluación de los efectos tóxicos de ftalatos sobre poblaciones naturales de *Chironomus riparius* (Diptera): implicaciones en estudios de ecotoxicidad

Herrero O^{1*}, Planelló R¹, Gómez-Sande P^{2,3}, Aquilino M¹, Morcillo G¹

¹Grupo 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. ²Departamento de Zoología y Antropología Física, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Sur s/n, 15782 Santiago de Compostela. ³Estación de Hidrobiología "Encoro do Con", Universidad de Santiago de Compostela, Castroagudín s/n, 36617 Vilagarcía de Arousa.

Recibido 9 de septiembre de 2014 / Aceptado 15 de octubre de 2014

Resumen: Los quironómidos, un género de mosquitos no picadores, son organismos centinela en la evaluación de la calidad de las aguas y un modelo de relevancia ecotoxicológica para el estudio de los efectos de contaminantes ambientales. Son todavía muy escasos los trabajos con poblaciones naturales de este organismo en los que se valore la utilidad de biomarcadores moleculares en el análisis de la salud de individuos expuestos a múltiples variables de estrés. Nuestros resultados muestran que exposiciones de larvas de poblaciones naturales de *Chironomus riparius* a di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) y butil bencil ftalato (BBP), dos compuestos incluidos por la ECHA en la lista de sustancias de muy alta preocupación, provocan alteraciones rápidas en la expresión de diferentes genes relacionados con la respuesta celular de estrés (*hsp70* y *hsc70*), la ruta hormonal (*EcR* y *ERR*) y los mecanismos de detoxificación (*CYP4G*), así como en la actividad enzimática de GST. Ambos compuestos provocan respuestas diferentes en estas dianas, especialmente en las exposiciones más prolongadas, y tienen la capacidad de producir efectos tóxicos retardados. Son de especial relevancia los resultados que muestran la alteración de la ruta hormonal de la ecdisona, confirmando la capacidad disruptora endocrina en insectos de estos ftalatos. Por último, existen diferencias respecto a datos previos obtenidos con larvas de laboratorio, tanto en la toxicidad de DEHP y BBP como en el comportamiento de algunas dianas, lo que acentúa la necesidad de llevar a cabo análisis con diferentes poblaciones para conseguir una aproximación más realista a los efectos de contaminantes.

Palabras clave: Ecotoxicología, *Chironomus*, ftalatos, biomarcadores moleculares, RT-PCR

Abstract: Evaluation of the toxic effects of phthalates on natural populations of *Chironomus riparius* (Diptera): implications for ecotoxicity studies. Chironomids, a genus of non-biting midges, are considered sentinel organisms for the evaluation of water quality and an outstanding model in Ecotoxicology for studying the effects of environmental pollutants. In contrast to its widespread use in studies with laboratory cultures, the use of natural populations (chronically exposed to complex mixtures of pollutants in their environment) is still uncommon to assess the usefulness of molecular biomarkers in studying the health of populations under multiple stress conditions. In *Chironomus riparius*, our results show that both bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and benzyl butyl phthalate (BBP) cause rapid alterations in the activity of GST enzyme as well as in the expression profile of various genes related to cell stress response (*hsp70* and *hsc70*), to the hormonal route (*EcR* and *ERR*) and to detoxification mechanisms (*CYP4G*). Both compounds cause different responses to these targets, especially in longer exposures, and have the ability to

produce delayed toxicity. The alteration of the ecdysone hormone pathway in our experiments has special relevance, since it proves that both compounds are endocrine disruptors in insects. Finally, this study shows differences with previous data obtained with laboratory cultures in both the toxicity of these phthalates and the behavior of some targets, which emphasizes the need of carrying out studies with different populations to get a more realistic approach to the effects of contaminants.

Keywords: Ecotoxicology, *Chironomus*, phthalates, molecular biomarkers, RT-PCR

Introducción

El deterioro ambiental que en las últimas décadas se viene produciendo a causa de multitud de contaminantes químicos de origen antropogénico es quizás más preocupante en los ecosistemas acuáticos, donde estas sustancias se integran en un complejo ciclo en el que están implicados las aguas, los sedimentos y los organismos, pudiendo tener un efecto tóxico directo y/o bioacumularse a través de las cadenas tróficas. Muchos de los contaminantes persistentes, bioacumulables y tóxicos se asocian fuertemente con los sedimentos a causa de sus características físico-químicas e ingresan frecuentemente en la cadena alimentaria a través de los organismos bentónicos, que constituyen la base de la alimentación de organismos superiores. En último término, se acumulan en predadores, entre los que se incluye el hombre, lo que pone de manifiesto la importancia de analizar el efecto de su toxicidad para organismos de las escalas inferiores de las redes tróficas.

De entre esa multitud de contaminantes, el grupo de los ftalatos ha despertado un gran interés en los últimos años debido a su elevada producción, su carácter ubicuo y las diversas propiedades tóxicas de varios de sus miembros [1-3]. Son compuestos oleosos, incoloros, inodoros y con múltiples aplicaciones en la industria, en medicina y en productos de consumo. Se emplean como plastificantes, en dispositivos de uso médico, cosméticos, envases alimentarios, calzado, cables eléctricos, embalajes, juguetes, pavimentos, etc. [4-6]. Dentro de este grupo de sustancias se encuentran, entre otras, el di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) y el butil bencil ftalato (BBP), ambos identificados por la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA) como sustancias de muy alta preocupación (SVHC, *substance of very high concern*) por sus propiedades tóxicas para la reproducción [7-9].

El DEHP es un líquido incoloro soluble en disolventes apolares y muy poco soluble en agua. Es el plastificante más usado en el mundo y también el más empleado en la fabricación de productos médicos [3,10]. Por su elevado coeficiente de reparto octanol-agua cabe

* e-mail: oscar.herrero@ccia.uned.es

esperar que el DEHP disponible en el medio se adsorba fuertemente a la materia orgánica, lo que unido a su baja solubilidad en agua hace que tenga mayor afinidad para unirse a la fase particulada de los medios en los que se encuentra [11]. Los valores de bioacumulación del DEHP varían en función de las especies empleadas en los estudios, fundamentalmente debido a las distintas tasas de metabolización existentes entre unas y otras [12].

La mayoría de los datos disponibles en la actualidad acerca de la toxicidad del DEHP proceden de estudios experimentales *in vivo* en vertebrados, existiendo evidencias suficientes de su toxicidad en órganos reproductores [13,14], hígado, riñón [15-17] y aparato respiratorio [18]. Asimismo, se han descrito efectos teratogénicos [19], carcinogénicos [16,17,20] y genotóxicos, aunque el compuesto no parece inducir lesiones directas en el ADN en la mayor parte de los estudios y estos resultados pueden ser atribuibles a otras vías diferentes, como la epigenética [21,22]. Puede alterar diferentes parámetros reproductivos y del desarrollo [23-27] y se ha descrito su capacidad disruptora endocrina en distintas especies [3,28]. En quironómidos, el DEHP provoca un descenso en las tasas de eclosión de huevos [29], alteraciones del desarrollo larvario [30] y variaciones en los niveles de expresión de genes que codifican para las proteínas de choque térmico HSP40, HSP70 y HSP90 [31-33], la proteína ribosómica S3 [34], los genes de la ruta hormonal *EcR* y *ERR* [33,35], de la alcohol deshidrogenasa [36], la endopeptidasa [37], la calponina [38] y la hemoglobina [32].

En cuanto al BBP, es también un líquido incoloro y poco soluble en agua. Además de su uso principal como plastificante [2], aparece también como intermediario orgánico, solvente y fijador en perfumes [39]. La separación del BBP de los materiales que lo contienen y su entrada en el medio ambiente se produce fundamentalmente a partir de los residuos depositados en vertederos, los procesos de incineración y los lodos provenientes de Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDAR), unas veces eliminados en vertederos y otras empleados como enmiendas orgánicas para la fertilización de suelos [39,40].

En cuanto a los efectos adversos del BBP sobre la salud humana y medioambiental, los estudios son mucho menos numerosos que en el caso del DEHP. El compuesto ha demostrado afectar al comportamiento de los organismos expuestos [41,42] y a la calidad de su esperma [6,43], ser estrogénico [44,45], alterar la síntesis de vitelogenina [44] y los niveles de peroxidación lipídica, así como la expresión de genes codificantes para enzimas relacionadas con el metabolismo de xenobióticos (citocromos, catalasa y receptor de andrógenos) [46]. Estudios *in vitro* han comprobado que el BBP se une al receptor de estrógenos [45,47,48]. En invertebrados, se han observado descensos significativos en la actividad fenoloxidasas y superóxido/reductasa [49], así como efectos adversos sobre la embriogénesis y el desarrollo larvario [50] y el éxito reproductivo y la esperanza de vida [51]. Por último, la exposición a BBP de larvas de *Chironomus riparius* provocó en éstas un aumento de la mortalidad, alteraciones en sus niveles de ARNr de nueva síntesis y variaciones significativas de la expresión de los genes *hsp70* y *EcR* [33].

Los estudios sobre el impacto biológico de los ftalatos en invertebrados, en especial en organismos bentónicos, siguen siendo muy limitados en la actualidad, aunque numerosos informes a nivel internacional abogan por la necesidad de conocer en detalle los efectos que provocan en estos grupos animales [52,53] debido a su importancia en el mantenimiento de la homeostasis de los ecosistemas. Actualmente, un importante número de alternativas en Toxicología Ambiental se basan en el empleo de organismos

inferiores y/o no protegidos por la legislación actual [54-57], entre los que los quironómidos han sido considerados organismos modelo en estudios de contaminación natural o antropogénica [58,59] y en el análisis de la bioacumulación de contaminantes tóxicos asociados a sedimentos [60,61], habiéndose empleado para ello tanto poblaciones cultivadas y mantenidas en laboratorio como poblaciones naturales [62-64].

Asimismo, la genómica ambiental combina técnicas moleculares de alto rendimiento en poblaciones naturales con los actuales enfoques ecotoxicológicos, favoreciendo la aparición de herramientas moleculares que, desde una perspectiva ecológica, posibiliten un conocimiento más profundo de las respuestas específicas de los organismos a contaminantes [65] y conduzcan hacia una evaluación del riesgo más eficaz [66]. En este sentido, aunque en última instancia son los cambios en los patrones de proteínas los responsables de un efecto fisiológico en los seres vivos, la detección temprana mediante técnicas de PCR de variaciones en el patrón de actividad génica, expresada en términos de alteraciones en los niveles de ARN, resulta una aproximación de gran utilidad para analizar los daños provocados por la exposición a tóxicos [67]. Sin embargo, hasta la fecha, el análisis de biomarcadores moleculares en poblaciones de campo es muy limitado en este grupo de insectos.

Los estudios ecotoxicológicos convencionales a menudo no tienen en cuenta la complejidad de la vida en la naturaleza, existiendo una falta de correspondencia entre las condiciones de laboratorio y las de campo que puede conducir a errores en las evaluaciones del riesgo ecológico [68]. En este contexto, los efectos de la exposición a sustancias tóxicas deben ser analizados también en organismos procedentes de escenario reales, adaptados a multitud de factores de estrés en su medio habitual, como por ejemplo la exposición crónica a mezclas complejas de contaminantes. En el presente trabajo se seleccionaron diferentes parámetros subcelulares y moleculares de *Chironomus riparius* con el fin evaluar los efectos tóxicos del DEHP y el BBP en larvas procedentes de un hábitat natural y valorar su posible utilidad como biomarcadores tempranos de exposición a estos compuestos.

Material y métodos

Especie de estudio y área de muestreo

Los experimentos se llevaron a cabo con larvas acuáticas de estadio IV del mosquito *Chironomus riparius* (Meigen), organismo de referencia en toxicología acuática. Para su recolección se empleó una pequeña red de mano de 15 cm de diámetro, 20 cm de profundidad y 250 µm de luz de malla. Para la recolección de muestras del organismo de ensayo, se seleccionaron cuatro puntos dentro de un área del río Sar que engloba aproximadamente 100 metros de rivera a ambos lados del puente de la carretera que enlaza Bertamiráns con A Condomiña (A Coruña, España, 42°51'22.99"N 8°38'53.58"O). Las propiedades físico-químicas de la columna de agua en dichos puntos se midieron *in situ* y sus valores medios se detallan en la Tabla 1.

Compuestos y tratamientos

Para el presente estudio se seleccionaron dos plastificantes pertenecientes al grupo de los ftalatos: di (2-etilhexil) ftalato (DEHP; N° CAS 117-81-7; Fluka) y butil bencil ftalato (BBP; N° CAS 85-68-7; Fluka). Para cada uno de ellos, la concentración evaluada fue 1 µg·L⁻¹, seleccionada en base a trabajos previos con este organismo [31,36-38] y a concentraciones de estos compuestos detectadas en escenarios naturales [12,39]. La concentración de estudio se obtuvo

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de muestras de agua del río Sar procedentes de los puntos seleccionados para la recolección de *C. riparius* (valores medios) [69].

| | |
|---|-------|
| T (°C) | 16.4 |
| pH | 6.8 |
| Oxígeno disuelto (mg·L ⁻¹) | 6.16 |
| Saturación de oxígeno (%) | 84.1 |
| Conductividad (µS·cm ⁻¹) | 228 |
| Sólidos disueltos totales (mg·L ⁻¹) | 145.8 |
| Materia orgánica (%) | 2.3 |

añadiendo el volumen adecuado de una solución madre del compuesto en etanol absoluto (BDH Prolabo) a 30 ml de medio de cultivo salino [CaCl₂ (0,5 mM), NaCl (1mM), MgSO₄ (1mM), NaHCO₃ (0,1mM), KH₂PO₄ (0,025mM), FeCl₃ (0,01mM)] preparado según los protocolos estandarizados para ensayos de toxicidad [55,70], en cubetas individuales, bajo condiciones de aireación constante a 20°C y periodos de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Todos los reactivos empleados para el medio de cultivo son de VWR. Los tratamientos consistieron en la exposición de grupos de 30 larvas a uno u otro compuesto durante 24 o 48 horas (toxicidad aguda), así como en su exposición durante 24 horas y mantenimiento 24 horas más en medio de cultivo sin el compuesto (toxicidad retardada). Todos los tratamientos contaron con un total de 20 larvas divididas en grupos de cinco, realizándose por triplicado los experimentos con cada uno. Se llevaron en paralelo controles y controles con etanol (con una concentración del 0,1%, la misma empleada para vehicular los ftalatos en los grupos expuestos), no detectándose diferencias estadísticas entre ambos en ninguna de las dianas estudiadas. Transcurrido el tiempo de cada tratamiento, se llevó a cabo el recuento de las larvas supervivientes en las cubetas y éstas se almacenaron en grupos de 5 en viales de congelación a -80°C hasta su uso posterior para los análisis de expresión génica o de actividad enzimática.

Extracción de ARN

El ARN de las larvas congeladas tras los tratamientos se extrajo utilizando isotiocianato de guanidina. Para ello, se homogenizaron en 500 µL de TRIzol® (Invitrogen™) y se incubaron 5' a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron 10' a 4 °C 10000 rpm. Una vez recogido el sobrenadante se añadieron 150 µL de cloroformo, incubando a temperatura ambiente durante 3'. A continuación se centrifugaron durante 15' a 4°C y 15000 rpm. La fase acuosa fue transferida a otro tubo, al que se añadieron 150 µL de isopropanol (BDH Prolabo) para precipitar el ARN. Tras incubar durante 10' a temperatura ambiente, se centrifugaron las muestras a 10000 rpm a 4°C durante 15'. Tras un lavado con 500 µL con etanol al 70%, las muestras se resuspendieron en agua DEPC, se trataron con DNasa libre de RNasa (Roche) y se retiraron las enzimas mediante fenolización. Finalmente, se determinó la cantidad y calidad del RNA de cada muestra en gel de agarosa al 1,5% y midiendo la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf).

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Los estudios de expresión génica se llevaron a cabo mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Para la transcripción inversa se empleó el kit comercial *M-MLV Reverse Transcriptase*

(Invitrogen™) a partir de 500 ng de ARN de cada muestra. A cada una se añadieron 1 µL Oligo (poliT) (0,5 µg/µL) (Sigma), 1 µL dNTP Mix (10 mM) (Biotools) y agua DEPC hasta un volumen final de 12 µL. La mezcla se incubó durante 5' a 65°C y se mantuvo en hielo durante 10'. A continuación se añadieron 4 µL First-Strand Buffer (5x) (Invitrogen™), 2 µL DTT (0.1 M) (Invitrogen™), 1 µL de M-MLV RT (Invitrogen™) y se incubaron 50' a 37°C, inactivando posteriormente la reacción a 70°C durante 15'.

Partiendo del ADNc obtenido en la retrotranscripción, se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos de los genes de estudio mediante la técnica de PCR en un termociclador Sprint (Thermo Scientific). Como gen de referencia se utilizó *GAPDH*. Para evitar la saturación del gen de referencia y minimizar errores derivados del pipeteo, se preparó una mezcla con todos los componentes necesarios para la amplificación (incluido el ADNc) a excepción de los oligonucleótidos, que se añadieron específicamente a cada tubo. De este modo, para cada muestra de ADNc se pueden amplificar todos los genes a la vez y todos los tubos se preparan de manera homogénea. La PCR se llevó a cabo en 20 µL con 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Biotools), 0,4 mM de cada oligonucleótido y 0,2 µL de Taq Polimerasa (Biotools) en las siguientes condiciones: 30" desnaturalización, 15" anillamiento (a 55°C) y 10" de elongación final. Dependiendo de cada gen se realizaron amplificaciones de 24 o 30 ciclos. Los productos de la PCR se analizaron por medio de electroforesis en gel de acrilamida al 9% en TGE 1x durante 3 horas a voltaje constante de 60 mV. La captura de imágenes se realizó con el transiluminador UV del equipo Chemigenius 3 (Syngene) y las bandas obtenidas en los geles se cuantificaron con el software Image J 1.47q.

Tabla 2. Secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos empleados en los análisis de expresión génica. Se detallan los genes de estudio, los cebadores directo (F) e inverso (R), el origen de las secuencias para cada uno de ellos y las longitudes en pares de bases (pb) de los fragmentos que amplifican.

| Gen | Cebadores | Referencia | Longitud |
|--------------|---|------------|----------|
| <i>GAPDH</i> | F GGTATTTTCATTGAATGATCACTTTG R TAATCCTTGGATTGCATGT ACTTG | [71] | 110 pb |
| <i>hsc70</i> | F CGTGCTATGACTAAGGACAA R GCTTCATTGACCATACGTTTC | [72] | 239 pb |
| <i>hsp70</i> | F CATGTGAACGAGCCAAGAGA R TTGCCACAGAAGAAATCTTG | [73] | 274 pb |
| <i>EcR</i> | F AGACGGTTATGAACAGCC R CGAGCCATGCGCAACATC | [74] | 240 pb |
| <i>ERR</i> | F CTCAGCAAGTAAGGAGGAG R CGTCTAATAATGTGATCGG | [75] | 222 pb |
| <i>CYP4G</i> | F GACATTGATGAGAATGATGTTGGTG R TAAGTGGAACTGGTGGGTACAT | [76] | 340 pb |

Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas, las muestras previamente congeladas se homogeneizaron en 0,5 mL de tampón Tris-EDTA (40 mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,8, con medio completo EDTA 7x libre de proteasa (Roche)). Tras una centrifugación de 15' a 4°C y 500 rpm, se recogió el sobrenadante y se centrifugaron de nuevo a 4°C durante 30' a 10000 rpm. La determinación de la cantidad de proteínas en cada muestra se realizó con el kit *BCA Protein Assay Reagent* (Thermo Scientific). Las muestras se conservaron a -80°C hasta su uso.

Actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST)

La valoración de la actividad enzimática de GST se realizó a partir 25 µg de proteína con el kit *Glutathione S-Transferase assay* (Sigma),

basado en la utilización de 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) como sustrato para la detección de diferentes isozimas de esta enzima. La conjugación del grupo tiol del glutatión al CDNB produce un aumento en la absorbancia 340 nm. Para calcular los cambios en la actividad de la enzima se utilizaron las variaciones en los valores de absorbancia medida a 340 nm.

Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM, Nueva York, EE.UU.). Se realizaron test normalidad (Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (Levene) y los datos experimentales se analizaron en función de sus resultados, del siguiente modo:

- Muestras homogéneas y normales (paramétricas) se analizaron mediante ANOVA con un *post hoc* Games Howell o Tukey, en cada caso el más apropiado. Las diferencias se consideraron significativas a un valor $p < 0,05$.
- Muestras no homogéneas o no normales (consideradas no paramétricas), se analizaron mediante Kruskal-Wallis, determinando las diferencias entre los pares mediante la prueba U de Mann-Whitney. Las probabilidades se ajustaron mediante la corrección de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas a un valor $p < 0,05$.

Resultados

Análisis de la supervivencia

Se analizó en primer lugar la capacidad del DEHP y el BBP de comprometer la supervivencia de larvas expuestas a $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de uno u otro compuesto. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1, donde se observa un efecto dependiente de tiempo que no resultó estadísticamente significativo en ninguna de las condiciones analizadas. El DEHP resultó ser más tóxico que el BBP, especialmente en las exposiciones más largas, donde la mortalidad se acercó a valores del 40%. Los resultados de toxicidad retardada demuestran que la retirada de los compuestos del medio de cultivo no favoreció la supervivencia de las larvas, que incluso llegó a ser inferior en el caso del BBP en comparación con las 48 horas continuas de exposición, el tiempo equivalente.

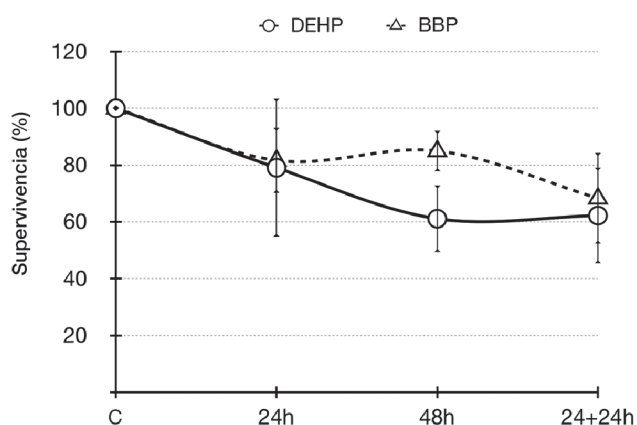


Figura 1. Supervivencia de larvas de *C. riparius* expuestas a $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de DEHP o BBP durante 24 y 48 horas, así como de larvas expuestas durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: tiempo. Ordenadas: porcentaje de supervivencia ($M \pm SE$). * Diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Estudios de expresión génica y actividad de GST

Los efectos provocados por el DEHP en los genes analizados consistieron en una disminución generalizada de los niveles de expresión génica (Figura 2). Se detectó una represión significativa de los genes de choque térmico (*hsc70* y *hsp70*) a las 48 horas de exposición, mucho más acentuada en el caso del receptor de la ecdisona (*EcR*) y casi completa en el del citocromo P450 (*CYP4G*). Para estos dos últimos genes y para el receptor relacionado con estrógenos (*ERR*) la represión resultó significativa ya desde las 24 horas. Cabe destacar la disminución de los niveles de transcrito observados en el gen *hsc70*, que habitualmente hace honor a su condición de gen constitutivo mostrando una gran estabilidad, viéndose sin embargo en esta ocasión afectado por la exposición a DEHP en los experimentos de mayor duración.

En los experimentos de toxicidad retardada sobresalen la fuerte recuperación del gen *hsp70*, que no mostró efecto aparente tras 24 horas de exposición a DEHP y alcanzó valores tres veces y media por encima de los del control en las 24 horas siguientes sin el compuesto, así como la recuperación de la actividad del gen *EcR*, aunque sin llegar a alcanzar los valores de las larvas no expuestas. Por el contrario, los genes *ERR* y *CYP4G* no solo no fueron capaces de reactivarse tras la represión producida a las 24 horas de tratamiento, sino que su represión se acentuó notablemente en las 24 horas siguientes.

Respecto a los efectos sobre las rutas de detoxificación, las respuestas observadas fueron notablemente distintas entre los niveles de expresión del gen *CYP4G* y de actividad de la enzima glutatión S-transferasa, representantes respectivamente de las rutas de desintoxicación de fase I y fase II. Mientras que *CYP4G* manifestó una represión significativa desde las primeras 24 horas, que se acentuó tras la retirada del tóxico y llevó a una inhibición casi absoluta en las exposiciones continuadas de 48 horas, la actividad de GST se vio favorecida significativamente tras 24 horas de contacto con el compuesto y mantuvo valores próximos a los del control en todos los experimentos de 48 horas.

En el caso de las exposiciones a BBP, la respuesta de los distintos genes estudiados fue notablemente distinta a la observada con el otro ftalato. Mientras que con el DEHP los niveles de expresión tendían a reprimirse de manera generalizada, las larvas expuestas a BBP manifestaron por lo general un claro aumento en los niveles de transcrito, especialmente en los tiempos más largos (Figura 3).

En primer lugar, los resultados reflejan la clara inducción de los dos genes de estrés estudiados, alcanzando en el caso de *hsp70* valores 15 veces por encima de los del control. Tal y como se ha comentado para el caso del DEHP, destaca de nuevo la alteración de los niveles del gen constitutivo *hsc70*, que en esta ocasión sufre una significativa activación dependiente de tiempo.

El efecto del BBP fue muy similar en los dos genes seleccionados de la ruta endocrina de los insectos (*EcR* y *ERR*), en los que produjo una notable represión tras 24 horas de exposición al compuesto seguida de una fuerte sobreexpresión en las 24 horas siguientes con o sin tóxico, llegando a superar en este último caso en más de 5 veces los valores obtenidos con larvas no expuestas.

En cuanto a las rutas de detoxificación, por un lado el BBP indujo notablemente los procesos de fase I mediante la sobreexpresión significativa del gen *CYP4G* en todas las condiciones experimentales analizadas, al contrario de lo ocurrido en las exposiciones a DEHP. Especialmente destacables son el drástico aumento de la transcripción en las exposiciones de 48 horas, más de 11 veces por

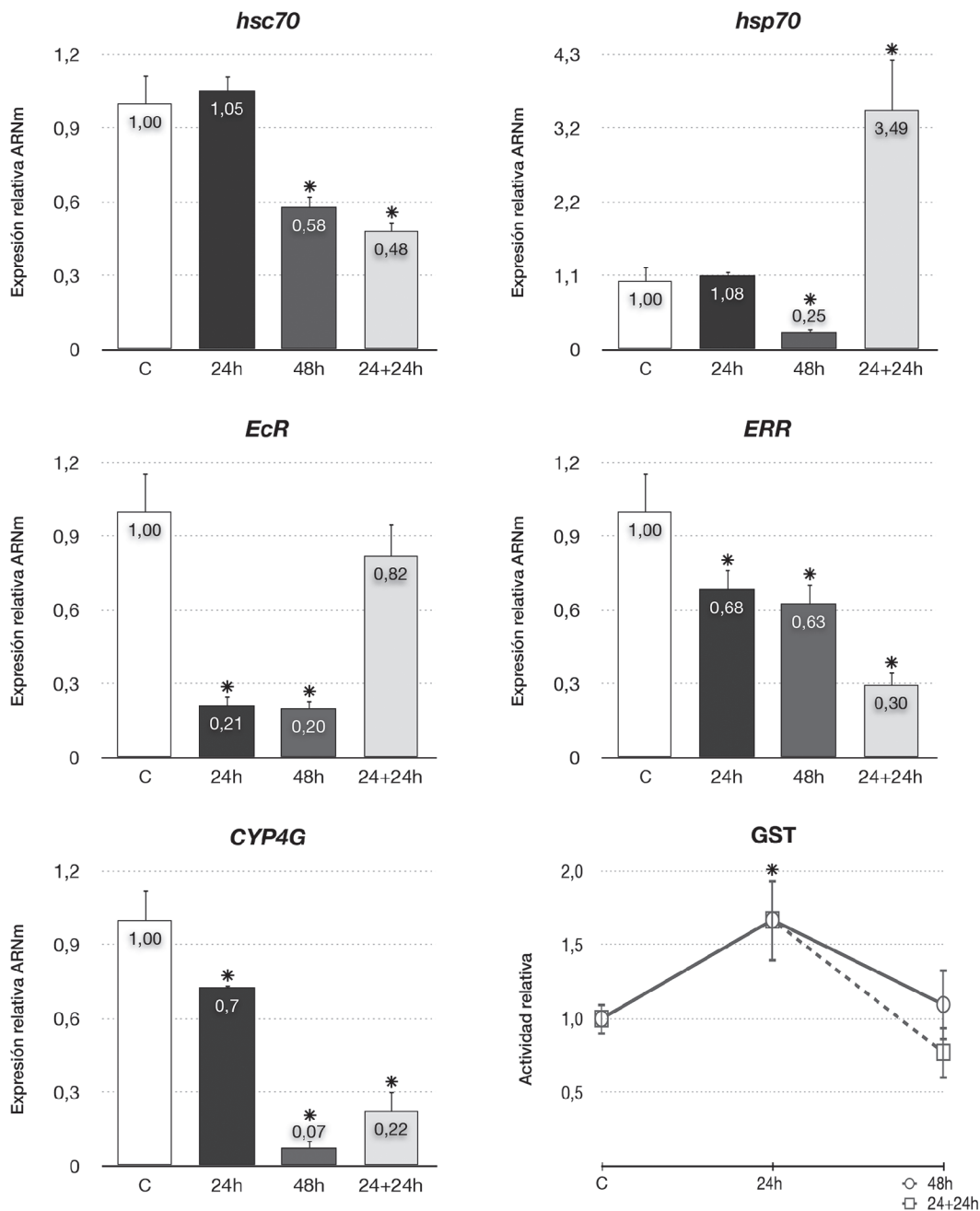


Figura 2. Análisis de la expresión génica (*hsc70*, *hsp70*, *EcR*, *ERR* y *CYP4G*) y la actividad enzimática (*GST*) de larvas de *C. riparius* expuestas a $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de DEHP durante 24 y 48 horas, así como de larvas expuestas a DEHP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: tiempo. Ordenadas: expresión relativa de ARNm ($M \pm SE$). * Diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

encima de los controles, y la incapacidad de las larvas de retornar a los valores de los controles 24 horas después de haber retirado el compuesto del medio. Por otro lado, los procesos de fase II sí tuvieron un comportamiento similar en los dos ftalatos, aunque en el caso del BBP la exposición más prolongada al compuesto llegó a reducir significativamente la actividad enzimática de GST en más de un 50%.

Por último, los ensayos de toxicidad retardada mostraron cómo la retirada del BBP del medio de cultivo provocó una fuerte inducción de la actividad de todos los genes analizados. Este hecho contrasta con la incapacidad de las larvas de reactivar estos mismos genes en

los tratamientos con DEHP, en los que sólo se activó *hsp70* y lo hizo con una intensidad tres veces menor que en el caso del BBP.

Discusión

Los potenciales efectos adversos sobre la fauna silvestre de una cada vez mayor cantidad de compuestos antropogénicos eliminados en el medio ambiente como residuos han cobrado gran importancia tanto en lo concerniente a la salud ambiental como en lo que respecta a los

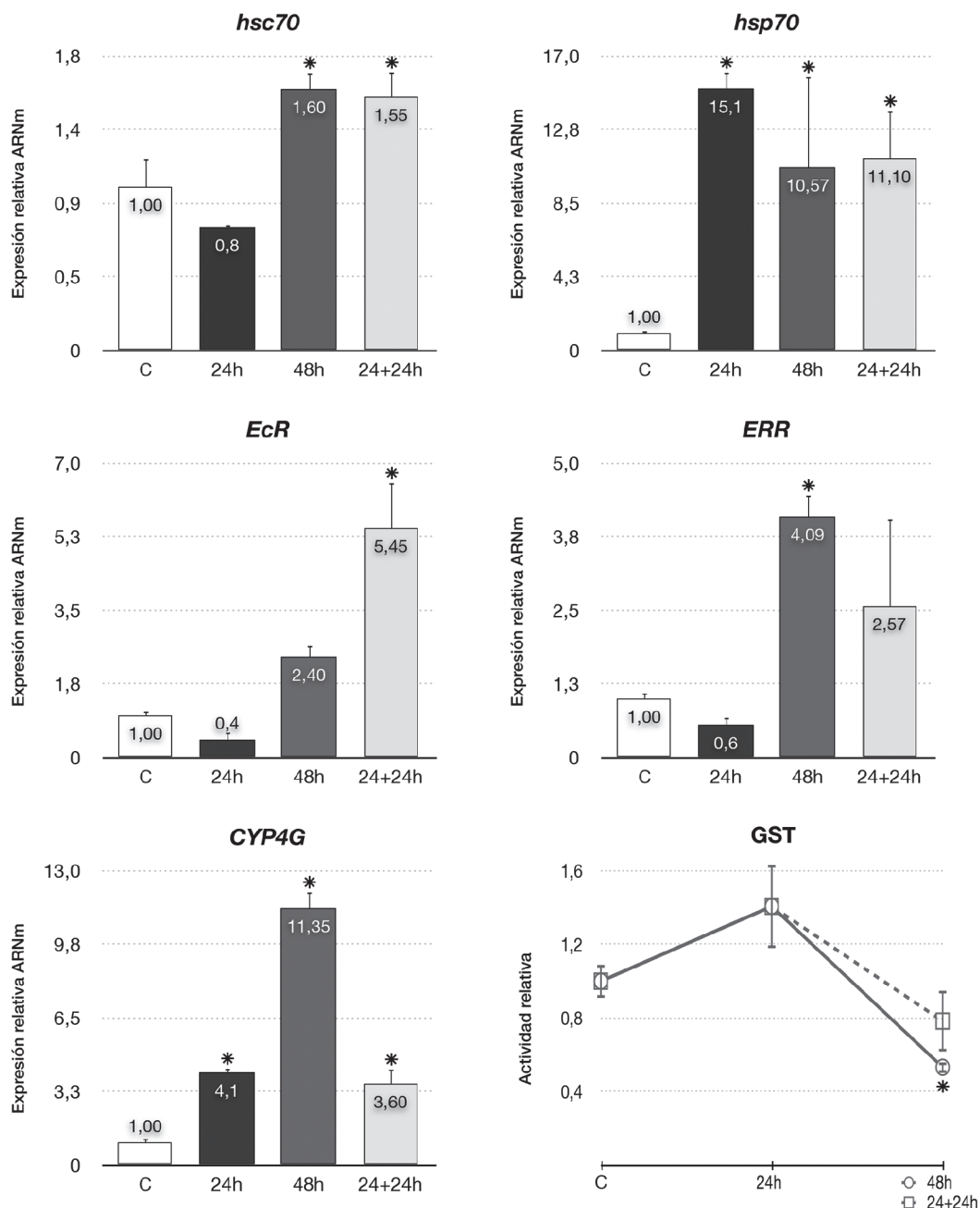


Figura 3. Análisis de la expresión génica (*hsc70*, *hsp70*, *EcR*, *ERR* y *CYP4G*) y la actividad enzimática (GST) de larvas de *C. riparius* expuestas a 1 µg·L⁻¹ de BBP durante 24 y 48 horas, así como de larvas expuestas a BBP durante 24 horas y mantenidas en medio de cultivo fresco durante las 24 horas siguientes (24+24h). Abscisas: tiempo. Ordenadas: expresión relativa de ARNm (M ± SE). * Diferencias significativas (p ≤ 0,05).

riesgos sobre la salud humana. Amén de la preocupación causada por las sustancias individuales, se consideran cada vez más relevantes los efectos producidos por las mezclas múltiples de sustancias, que suponen una aproximación más realista a las condiciones que se pueden encontrar en las aguas contaminadas. Un claro ejemplo de ello es la reciente clasificación de la contaminación atmosférica, entendida como una mezcla compleja de sustancias, en el Grupo 1 de los agentes evaluados por la IARC, como carcinógena en humanos [77].

Los organismos acuáticos están expuestos de manera permanente a gran variedad de contaminantes ambientales, muchos de los cuales se consideran persistentes. En estos ambientes la fauna bentónica

resulta de gran importancia, dado que representa una parte importante de la red alimenticia y además puede bioacumular determinados contaminantes, como metales, y servir de entrada de los mismos en la cadena trófica [78]. En este sentido, uno de los retos a los que se enfrenta la Ecotoxicología es llegar a comprender las respuestas biológicas de poblaciones naturales de organismos acuáticos, expuestas a una gran variedad de contaminantes químicos, así como mejorar las herramientas de control de la calidad del agua, capaces de detectar efectos subletales en comunidades biológicas expuestas a tóxicos. La aproximación más tradicional a estos efectos se ha centrado en el análisis de la supervivencia, el crecimiento, el desarrollo y la reproducción, tanto en poblaciones naturales como en

organismos modelo en laboratorio [79,80]. Sin embargo, nuevas líneas de investigación focalizadas en parámetros moleculares revelan información acerca de dianas celulares específicas, capaces de arrojar luz sobre el modo de acción de los tóxicos analizados y los mecanismos de respuesta aguda y/o crónica de los organismos expuestos a estos compuestos en ambientes contaminados. Además, han demostrado ser herramientas de gran utilidad algunos marcadores bioquímicos, como la medida de distintas actividades enzimáticas [81,82], y distintos marcadores génicos capaces de aportar de manera rápida y sensible información sobre los compuestos de estudio [83]. Sin embargo, el escaso conocimiento de los genomas de invertebrados acuáticos hace que en la actualidad todavía sean pocos los estudios que tratan de analizar desde un punto de vista ecotoxicogenómico el comportamiento de estas poblaciones naturales en sus ambientes contaminados, habiéndose llevado a cabo los avances más importantes en distintas especies de vertebrados, especialmente peces [84].

Aunque el desarrollo de biomarcadores requiere un trabajo experimental previo en condiciones controladas de laboratorio, de manera que se puedan identificar respuestas específicas a determinados compuestos químicos, resulta necesaria su validación posterior en poblaciones naturales expuestas a una mezcla compleja de contaminantes antes de poder sacar conclusiones acerca de su utilidad en escenarios reales.

En el presente trabajo se han analizado por vez primera los efectos específicos de dos tóxicos, ftalatos en este caso, sobre larvas de *Chironomus riparius* que proceden de poblaciones naturales y que, previamente al contacto con estos tóxicos, tienen sus sistemas metabólicos adaptados a las condiciones físico-químicas del nicho ecológico en el que habitan.

Nuestros resultados muestran que la exposición de las larvas de campo a los dos ftalatos estudiados no alteró de manera significativa la tasa de supervivencia de las mismas, siendo el DEHP el más tóxico en las exposiciones más largas (48h). A pesar de esta falta de significación estadística, en el caso del BBP las larvas de poblaciones naturales resultaron ser más sensibles que las de cultivos de laboratorio, según resultados previos en los que los efectos sobre este parámetro comenzaban a aparecer a una concentración de $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, mil veces superior [33].

Los estudios de los distintos marcadores celulares seleccionados mostraron respuestas bien diferenciadas por parte de los dos ftalatos. De manera general, mientras el DEHP originó principalmente la represión de los genes analizados, el BBP tuvo precisamente el efecto contrario, provocando casi siempre una fuerte sobreexpresión de los mismos.

El análisis de la respuesta celular de estrés, bien caracterizada en *Chironomus* [77], resulta de gran interés dado que la familia de genes de choque térmico codifica para proteínas que pueden ser responsables de la supervivencia y adaptación de las células bajo condiciones adversas, como la exposición a xenobióticos [78], siendo las proteínas de 70 kDa unas de las evolutivamente más conservadas y contando con miembros tanto constitutivos como inducibles [79], como HSC70 y HSP70, respectivamente. La variación significativa de los niveles de expresión de *hsc70*, detectada tanto en las exposiciones más prolongadas a DEHP y BBP como en los estudios de la toxicidad retardada de ambos compuestos, resulta llamativa dado que tradicionalmente ha demostrado su condición de gen *housekeeping* [80] mostrando una robusta estabilidad ante múltiples situaciones de estrés. En este sentido, estos resultados chocan con los

de trabajos previos en *Chironomus* que confirman la habitual inalterabilidad de los niveles de *hsc70* ante situaciones de estrés ambiental [68] o exposiciones a múltiples xenobióticos [71-74], incluso a concentraciones cien mil veces más altas de estos dos mismos ftalatos [33,73]. Por otro lado, las variaciones del gen *hsp70* demuestran que ninguno de los compuestos desencadena una respuesta tradicional de choque térmico en las condiciones evaluadas, provocando el BBP una sobreexpresión mucho más marcada (más de 10 veces los valores del control) que la habitual en ese tipo de respuestas (alrededor de 4 veces [73]) y disminuyendo el DEHP los niveles de transcrito tras 48 horas de exposición, en lo que será la tendencia general de este compuesto para todas las dianas analizadas. Dado que la proteína HSP70 juega un importante papel en el correcto plegamiento del receptor de la ecdisona, estando en vertebrados involucrada junto con otras chaperonas en la estabilización y activación del receptor de la hormona esteroidea, es probable que las variaciones en los niveles de expresión de estos genes puedan traer consigo la alteración de la ruta hormonal mediada por ecdisona, al influir sobre el receptor de esta hormona [81].

Tanto el DEHP como el BBP se encuentran catalogados como contaminantes emergentes con capacidad de alterar el sistema endocrino a través de distintas vías, incluyendo la epigenética [2,3], habiendo demostrado ser tóxicos tanto para la reproducción como para el desarrollo. Los ecdisteroides como la ecdisona juegan un papel esencial en el desarrollo, el crecimiento, la reproducción y la embriogénesis en artrópodos [82,83]. Estudios previos han demostrado la capacidad de muchos contaminantes ambientales de actuar como agonistas o antagonistas de las hormonas esteroideas en invertebrados [84], pudiendo modular sus perfiles de expresión y produciendo así alteraciones en los mecanismos de regulación hormonal. Por otro lado, los receptores relacionados con estrógenos actúan como factores de transcripción dependientes de ligando y están implicados en importantes procesos metabólicos relacionados con el origen de distintos tipos de tumores y la regulación de la demanda energética, entre otros [85]. El análisis de la expresión de los genes *EcR* y *ERR* mostró una respuesta pareja del DEHP y el BBP tras las primeras 24 horas de exposición, caracterizada por una notable represión de ambas dianas, y un claro efecto antagónico en los estudios más prolongados. Así, mientras que en el caso del DEHP la represión se mantuvo tras 48 horas y los niveles de expresión no se recuperaron ni siquiera con la retirada del tóxico del medio, tanto la exposición durante 48 horas a BBP como los estudios de toxicidad retardada con este compuesto dispararon los niveles de estos genes, de manera especialmente llamativa en el caso del receptor de la ecdisona. Es posible que un efecto tóxico general de ambos ftalatos sea la causa del descenso de la actividad transcripcional de *EcR* a las 24 horas, mientras que los altos niveles detectados en el caso del BBP podrían deberse a la capacidad de este compuesto de imitar el comportamiento de la forma activa de la ecdisona (20E), mostrando de este modo un efecto disruptor endocrino en este modelo experimental, en consonancia con resultados previos obtenidos con cultivos de laboratorio [33].

Por último, ambos compuestos mostraron también claras diferencias en su comportamiento tóxico al estudiar sus efectos sobre el metabolismo de desintoxicación relacionado con el citocromo P450. La alteración de los sistemas enzimáticos que protegen a las células ante la exposición a sustancias perjudiciales puede condicionar el correcto funcionamiento de los procesos de eliminación de un tóxico tras su metabolización y la capacidad de una sustancia para bioacumularse, amén de que alteraciones en estos sistemas llevan

asociados daños celulares ante los que un organismo puede adaptarse, por ser leves o pasajeros, o bien sucumbir, cuando la homeostasis celular se ve seriamente comprometida. La monooxigenasa dependiente del citocromo P450 se ha detectado en todos los organismos examinados, de bacterias a mamíferos, y representa el sistema enzimático más importante en lo que a la desintoxicación de xenobióticos se refiere. En insectos, este sistema resulta crucial tanto en la regulación de los niveles de moléculas endógenas, como hormonas, ácidos grasos y esteroides, como en la biotransformación de xenobióticos y pesticidas [86]. Las enzimas P450 se encuentran asimismo en las rutas de biosíntesis de las hormonas ecdisteroides y juvenil, las cuales juegan un papel fundamental en el crecimiento, el desarrollo y la reproducción de los insectos [87]. Este sistema enzimático ha demostrado ser inducible tras la exposición de los organismos a gran variedad de compuestos químicos, entre los que se incluyen algunas de las principales clases de contaminantes ambientales [86,88]. En el presente trabajo, el análisis de los niveles de expresión de *CYP4G* mostró claras diferencias entre los dos ftalatos evaluados. Por un lado, el DEHP produjo en todos los casos una fuerte represión en los niveles de expresión de este gen, induciendo un daño que las larvas no eran capaces de revertir en los estudios de toxicidad retardada y llegando a inhibir por completo este gen en los tratamientos más largos. Por otro lado, el BBP produjo una fuerte sobreexpresión del gen en todas las condiciones, evidenciando así la notable capacidad de este compuesto de activar el metabolismo de desintoxicación de fase I en las larvas de *Chironomus*.

Por su parte, los biomarcadores que emplean medidas de la actividad enzimática para detectar bajos niveles de contaminantes están siendo cada vez más utilizados en las evaluaciones del riesgo de ecosistemas acuáticos [89] y gracias a ellos es posible identificar la incidencia y los efectos de la exposición a xenobióticos, proporcionando una alerta temprana de sus potenciales efectos dañinos incluso en los niveles más altos de organización biológica [90]. Las glutatión S-transferasas constituyen una familia diversa de enzimas multifuncionales de desintoxicación de fase II, se han encontrado en casi todos los organismos vivos y son también un biomarcador bioquímico popular, capaz de detectar la presencia de diversos xenobióticos a partir de la medida de su inducción [91]. La actividad enzimática de GST sí se vio alterada de forma pareja por los dos ftalatos estudiados, destacando un aumento tras 24 horas de exposición que en tiempos más largos se tornó en falta de efecto o en descenso de actividad, llegando a ser éste último significativo tras 48 horas en presencia de BBP. En conjunto, por tanto, nuestros resultados parecen indicar que tanto DEHP como BBP son capaces de modular significativamente las respuestas de desintoxicación de fase I dependientes de citocromo P450, mientras afectan ligeramente a las de fase II en las que está involucrada la enzima GST.

Nuestros resultados confirman la necesidad de llevar a cabo estudios en diferentes poblaciones para conseguir definir con mayor exactitud las dianas de efecto que se ven alteradas por la exposición a estos compuestos, así como el tipo de respuesta que desencadenan en función de las circunstancias particulares de un escenario real, en el que las larvas están sometidas de forma crónica en mayor o menor grado a mezclas complejas de contaminantes.

Conclusiones

Nuestros resultados demuestran que exposiciones de larvas de *Chironomus riparius* a DEHP y BBP provocan alteraciones rápidas

en dianas relacionadas con la respuesta celular de estrés, la ruta hormonal y los mecanismos de desintoxicación. De manera general, ambos compuestos difieren en el efecto que provocan, especialmente en las exposiciones más prolongadas, y manifiestan su capacidad de desencadenar una respuesta tóxica retardada una vez que las larvas han dejado de estar en contacto con ellos. De especial relevancia son los resultados obtenidos en relación a su actividad disruptora endocrina, dado que ambos alteran la ruta hormonal de la ecdisona. Por último, este estudio con larvas de campo muestra diferencias con respecto a datos previos con larvas de laboratorio, tanto en la toxicidad de estos ftalatos como en el comportamiento de algunas dianas. Este hecho es de gran importancia ecotoxicológica y sugiere la necesidad de llevar a cabo estudios con diferentes poblaciones para alcanzar un conocimiento más completo de los efectos potenciales de un tóxico.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a un proyecto financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (CTM2012-37547).

Bibliografía

1. Andrady AL, Neal M a. (2009) Applications and societal benefits of plastics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364:1977–84; doi:10.1098/rstb.2008.0304.
2. NTP-CERHR (2003) NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Butyl Benzyl Phthalate (BBP). National Institutes of Health, Bethesda.
3. NTP-CERHR (2006) NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). National Institutes of Health, Bethesda.
4. Staples C, Peterson D, Parkerton T, Adams WJ (1997) The Environmental Fate of Phthalate Esters: A Literature Review. *Chemosphere* 35: 667–749.
5. Horn O, Nalli S, Cooper D, Nicell J (2004) Plasticizer metabolites in the environment. *Water Res.* 38:3693–8; doi:10.1016/j.watres.2004.06.012.
6. Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Kloas W, Jagnytsch O, Lutz I, Kusk KO, et al (2009) A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364:2047–62; doi:10.1098/rstb.2008.0242.
7. ECHA (2008) Inclusion of substances of very high concern in the candidate list (Decision by the Executive Director). European Chemicals Agency, Helsinki.
8. ECHA (2008) Member State Committee Support Document for Identification of Benzyl butyl phthalate (BBP) as a Substance of Very High Concern.
9. ECHA (2008) Inclusion of substances of very high concern in the candidate list (Decision by the Executive Director). European Chemicals Agency, Helsinki.
10. FDA (2001) Safety Assessment of Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices. United States Food and Drug Administration, Rockville.

11. IPCS (1992) Environmental Health Criteria 131. Diethylhexyl phthalate. International Programme on Chemical Safety, Geneva.
12. ECB (2008) Bis (2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) CAS No : 117-81-7 EINECS No : 204-211-0 Summary Risk Assessment Report. European Chemicals Bureau, Luxembourg.
13. Moore RW, Rudy TA, Lin TM, Ko K, Peterson RE (2001) Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer Di(2-ethylhexyl)phthalate. *Environ. Health Perspect.* 109: 229–37.
14. Cammack JN, White RD, Gordon D, Gass J, Hecker L, Conine D, et al. (2003) Evaluation of reproductive development following intravenous and oral exposure to DEHP in male neonatal rats. *Int. J. Toxicol.* 22: 159–74.
15. Crocker JF, Safe SH, Acott P (1988) Effects of chronic phthalate exposure on the kidney. *J. Toxicol. Environ. Health* 23:433–44; doi:10.1080/15287398809531126.
16. David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D (2000) Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicol. Sci.* 55:433–43; doi:10.1093/toxsci/55.2.433.
17. David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D (2000) Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in mice. *Toxicol. Sci.* 58:377–85; doi:10.1093/toxsci/58.2.377.
18. Magliozzi R, Nardacci R, Scarsella G, Carlo V Di, Stefanini S (2003) Effects of the plasticiser DEHP on lung of newborn rats: catalase immunocytochemistry and morphometric analysis. *Histochem. Cell Biol.* 120:41–9; doi:10.1007/s00418-003-0543-2.
19. Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ, et al. (2000) The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol. Sci.* 58:339–49; doi:10.1093/toxsci/58.2.339.
20. Voss C, Zerban H, Bannasch P, Berger MR (2005) Lifelong exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces tumors in liver and testes of Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 206:359–71; doi:10.1016/j.tox.2004.07.016.
21. ATSDR (2002) Toxicological Profile for Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.
22. Herrero O, Pérez Martín JM, Fernández Freire P, Carvajal López L, Peropadre A, Hazen MJ (2012) Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the Allium cepa test. *Mutat. Res.* 743: 20–4; doi:10.1016/j.mrgentox.2011.12.028.
23. Sharpe RM, Irvine DS (2004) How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ* 328: 447–51; doi:10.1136/bmj.328.7437.447.
24. Latini G, Felice C De, Presta G, Vecchio A Del, Paris I, Ruggieri F, et al. (2003) In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 111: 1783–5.
25. Lyche JL, Gutleb AC, Bergman A, Eriksen GS, Murk AJ, Ropstad E, et al. (2009) Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 12:225–49; doi:10.1080/10937400903094091.
26. Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, Mujtaba R (2002) Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertil. Steril.* 78:1187–94; doi:10.1016/S0015-0282(02)04389-3.
27. Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Ema M (2008) Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 50:37–49; doi:10.1016/j.yrtph.2007.09.004.
28. Carnevali O, Tosti L, Speciale C, Peng C, Zhu Y, Maradonna F (2010) DEHP impairs zebrafish reproduction by affecting critical factors in oogenesis. *M. Polymenised. PLoS One* 5:e10201; doi:10.1371/journal.pone.0010201.
29. Kim EJ, Lee SK (2004) Reduced viability of F1 egg ropes in *Chironomus riparius* exposed to di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP). *J. Environ. Biol.* 25: 259–61.
30. Kwak IS, Lee W (2005) Endpoint for DEHP exposure assessment in *Chironomus riparius*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 74:1179–85; doi:10.1007/s00128-005-0705-0.
31. Park K, Kwak I-S (2008) Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: effects of di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. *Chemosphere* 74:89–95; doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.041.
32. Lee S-M, Lee S-B, Park C-H, Choi J (2006) Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere* 65: 1074–81; doi:10.1016/j.chemosphere.2006.02.042.
33. Planelló R, Herrero O, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2011) Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of *Chironomus riparius* based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. *Aquat. Toxicol.* 105:62–70; doi:10.1016/j.aquatox.2011.05.011.
34. Park K, Kwak I-S (2012) Gene expression of ribosomal protein mRNA in *Chironomus riparius*: effects of endocrine disruptor chemicals and antibiotics. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 156:113–20; doi:10.1016/j.cbpc.2012.05.002.
35. Park K, Kwak I-S (2010) Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. *Chemosphere* 79:934–41; doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.002.
36. Park K, Kwak I-S (2009) Alcohol dehydrogenase gene expression in *Chironomus riparius* exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 150:361–7; doi:10.1016/j.cbpc.2009.05.015.
37. Park K, Kwak I-S (2008) Expression of *Chironomus riparius* serine-type endopeptidase gene under di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) exposure. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 151: 349–54; doi:10.1016/j.cbpb.2008.08.004.
38. Park K, Kwak I-S (2009) Calponin gene expression in *Chironomus riparius* exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Toxicol.* 24:555–62; doi:10.1002/tox.20463.
39. ECB (2007) European Union Risk Assessment Report - benzyl

- butyl phthalate (BBP). European Chemicals Bureau, Luxembourg.
40. Herrero O, Fernández JM, Hernández D, Montes P, Polo A, de la Peña E (2005) Mutagenicidad y ecotoxicidad de enmiendas orgánicas de suelos. *Rev. Toxicol.* 22: 1–4.
 41. Wibe AE, Billing A, Rosenqvist G, Jenssen BM (2002) Butyl benzyl phthalate affects shoaling behavior and bottom-dwelling behavior in threespine stickleback. *Environ. Res.* 89:180–7; doi:10.1006/enrs.2002.4360.
 42. Wibe AE, Fjeld E, Rosenqvist G, Jenssen BM (2004) Postexposure effects of DDE and butylbenzylphthalate on feeding behavior in threespine stickleback. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57:213–9; doi:10.1016/S0147-6513(03)00005-8.
 43. Ahmad R, Gautam AK, Verma Y, Sedha S, Kumar S (2014) Effects of in utero di-butyl phthalate and butyl benzyl phthalate exposure on offspring development and male reproduction of rat. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21:3156–65; doi:10.1007/s11356-013-2281-x.
 44. Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, et al. (2000) Development of a Reproductive Performance Test for Endocrine Disrupting Chemicals Using Pair-Breeding Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.* 34:3003–3011; doi:10.1021/es991292a.
 45. Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP (1995) A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* 103: 582–7.
 46. Mankidy R, Wiseman S, Ma H, Giesy JP (2013) Biological impact of phthalates. *Toxicol. Lett.* 217:50–8; doi:10.1016/j.toxlet.2012.11.025.
 47. Zacharewski TR, Meek MD, Clemons JH, Wu ZF, Fielden MR, Matthews JB (1998) Examination of the *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol. Sci.* 46:282–93; doi:10.1006/toxs.1998.2505.
 48. Blom A, Ekman E, Johannisson A, Norrgren L, Pesonen M (1998) Effects of Xenoestrogenic Environmental Pollutants on the Proliferation of a Human Breast Cancer Cell Line (MCF-7). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34:306–310; doi:10.1007/s002449900322.
 49. Sung H-H, Kao W-Y, Su Y-J (2003) Effects and toxicity of phthalate esters to hemocytes of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquat. Toxicol.* 64:25–37; doi:10.1016/S0166-445X(03)00011-0.
 50. Liu Y, Guan Y, Yang Z, Cai Z, Mizuno T, Tsuno H, et al. (2009) Toxicity of seven phthalate esters to embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Ecotoxicology* 18:293–303; doi:10.1007/s10646-008-0283-0.
 51. Wang J-X, Xi Y-L, Hu K, Liu X-B (2011) Effect of butyl benzyl phthalate on life table-demography of two successive generations of cladoceran *Moina macrocopa* Straus. *J. Environ. Biol.* 32: 17–22.
 52. Kang J-H, Asai D, Aasi D, Katayama Y (2007) Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.* 37:607–25; doi:10.1080/10408440701493103.
 53. Soin T, Smagghe G (2007) Endocrine disruption in aquatic insects: a review. *Ecotoxicology* 16:83–93; doi:10.1007/s10646-006-0118-9.
 54. EPA (1996) Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1735 Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates, Freshwater. United States Environmental Protection Agency, Washington.
 55. EPA (1996) Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1790 Chironomid Sediment Toxicity Test. United States Environmental Protection Agency, Washington.
 56. EU (2011) Reglamento (UE) no 544/2011 de la Comisión, de 10 de junio de 2011, por el que se aplica el Reglamento (CE) no 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los requisitos sobre datos aplicables a las sustancias activas. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 11 de junio de 2011, L155, Luxembourg.
 57. EU (2012) Reglamento (UE) no 528/2012, de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y el uso de los biocidas. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 27 de junio de 2012, L167, Luxembourg.
 58. Giesy JP, Rosiu CJ, Graney RL, Henry MG (1990) Benthic invertebrate bioassays with toxic sediment and pore water. *Environ. Toxicol. Chem.* 9:233–248; doi:10.1002/etc.5620090214.
 59. Brown D, Thompson RS, Stewart KM, Croudace CP, Gillings E (1996) The effect of phthalate ester plasticisers on the emergence of the midge (*Chironomus riparius*) from treated sediments. *Chemosphere* 32:2177–2187; doi:http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535(96)00128-2.
 60. Ankley GT, Schubauer-Berigan MK (1994) Comparison of techniques for the isolation of sediment pore water for toxicity testing. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27; doi:10.1007/BF00214842.
 61. ECB (2008) European Union Risk Assessment Report - bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). European Chemicals Bureau, Luxembourg.
 62. Chappie DJ, Burton GA (1997) Optimization of in situ bioassays with *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans*. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:559–564; doi:10.1002/etc.5620160323.
 63. Bleeker EA., Geest HG van der, Kraak MH., Voogt P de, Admiraal W (1998) Comparative ecotoxicity of NPAHs to larvae of the midge *Chironomus riparius*. *Aquat. Toxicol.* 41:51–62; doi:10.1016/S0166-445X(97)00070-2.
 64. Tucker KA, Burton GA (1999) Assessment of nonpoint-source runoff in a stream using in situ and laboratory approaches. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:2797–2803; doi:10.1002/etc.5620181221.
 65. Asselman J, Glaholt SP, Smith Z, Smagghe G, Janssen CR, Colbourne JK, et al. (2012) Functional characterization of four metallothionein genes in *Daphnia pulex* exposed to environmental stressors. *Aquat. Toxicol.* 110-111:54–65; doi:10.1016/j.aquatox.2011.12.010.
 66. Amiard J-C, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76:160–202; doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015.
 67. Piña B, Barata C (2011) A genomic and ecotoxicological

- perspective of DNA array studies in aquatic environmental risk assessment. *Aquat. Toxicol.* 105:40–9; doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.006.
68. Laskowski R, Bednarska AJ, Kramarz PE, Loureiro S, Scheil V, Kudłek J, et al. (2010) Interactions between toxic chemicals and natural environmental factors--a meta-analysis and case studies. *Sci. Total Environ.* 408:3763–74; doi:10.1016/j.scitotenv.2010.01.043.
 69. Planelló R, Servia MJ, Gómez-Sande P, Herrero O, Cobo F, Morcillo G (2013) Transcriptional responses, metabolic activity and mouthpart deformities in natural populations of *Chironomus riparius* larvae exposed to environmental pollutants. *Environ. Toxicol.*; doi:10.1002/tox.21893.
 70. OECD (2004) Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
 71. Park K, Kwak I-S (2009) Alcohol dehydrogenase gene expression in *Chironomus riparius* exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 150:361–7; doi:10.1016/j.cbpc.2009.05.015.
 72. Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2010) Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone-nuclear receptor genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Sci Total Environ* 408:1598–603; doi:10.1016/j.scitotenv.2010.01.004.
 73. Morales M, Planelló R, Martínez-Paz P, Herrero O, Cortés E, Martínez-Guitarte JL, et al. (2011) Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 153:150–8; doi:10.1016/j.cbpc.2010.10.003.
 74. Planelló R, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2008) The endocrine disruptor bisphenol A increases the expression of HSP70 and ecdysone receptor genes in the aquatic larvae of *Chironomus riparius*. *Chemosphere* 71:1870–6; doi:10.1016/j.chemosphere.2008.01.033.
 75. Park K, Kwak I-S (2010) Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. *Chemosphere* 79:934–41; doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.002.
 76. Martínez-Paz P, Morales M, Martínez-Guitarte JL, Morcillo G (2012) Characterization of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposures to xenobiotics (tributyltin, nonylphenol, bisphenol A) in *Chironomus riparius* aquatic larvae. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 155:333–43; doi:10.1016/j.cbpc.2011.10.001.
 77. Morcillo G, Diez JL, Botella LM (1994) Heat shock activation of telomeric sequences in different tissues of *Chironomus thummi*. *Exp Cell Res* 211:163–7; doi:10.1006/excr.1994.1072.
 78. Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra RK, Chowdhuri DK (2010) Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sci.* 86:377–84; doi:10.1016/j.lfs.2009.12.015.
 79. Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62:670–84; doi:10.1007/s00018-004-4464-6.
 80. Liao Y, Tang L (2014) The critical roles of HSC70 in physiological and pathological processes. *Curr. Pharm. Des.* 20:101–7.
 81. Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U (2003) Endocrine disruption in invertebrates. *Pure Appl. Chem.* 75:2207–2218; doi:10.1351/pac200375112207.
 82. Sekimoto T, Iwami M, Sakurai S (2006) Coordinate responses of transcription factors to ecdysone during programmed cell death in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 15:281–92; doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00641.x.
 83. Lafont R, Mathieu M (2007) Steroids in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology* 16:109–30; doi:10.1007/s10646-006-0113-1.
 84. Janer G, Porte C (2007) Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. *Ecotoxicology* 16:145–60; doi:10.1007/s10646-006-0110-4.
 85. Bianco S, Sailland J, Vanacker J-M (2012) ERRs and cancers: effects on metabolism and on proliferation and migration capacities. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 130:180–5; doi:10.1016/j.jsbmb.2011.03.014.
 86. Scott JG (1999) Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29:757–77.
 87. Feyereisen R (1999) Insect P450 enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* 44:507–33; doi:10.1146/annurev.ento.44.1.507.
 88. Hoffman DJ, Rattne BA, Burton Jr. GA, Cairns Jr., J (1995) *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton.
 89. Callaghan A, Fisher TC, Grosso A, Holloway GJ, Crane M (2002) Effect of temperature and pirimiphos methyl on biochemical biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52:128–33; doi:10.1006/eesa.2002.2160.
 90. McCarthy J, Shugart L (1990) Biological markers of environmental contamination. En *Biomarkers of Environmental Contamination* (J. McCarthy, L. Shugart eds.), pp. 3–14. Lewis Publishers, Boca Raton.
 91. Lagadic L, Caquet T, Ramade F (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (5). *Invertebrate populations and communities. Ecotoxicology* 3:193–208; doi:10.1007/BF00117084.