

# Nuestra Facultad

## TESIS DOCTORALES

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA DEL NONILFENOL, TRICLOSÁN Y BISFENOL A EN *CHIRONOMUS RIPARIUS*: IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES DE ECOTOXICIDAD

El desarrollo de la actividad industrial ha conducido a un aumento de la presencia de diferentes compuestos contaminantes de origen antropogénico en el medio ambiente y, como consecuencia, los seres vivos se encuentran expuestos a los mismos. La calidad de vida humana está relacionada directa o indirectamente con la salud del medio ambiente que nos rodea, constituido por componentes abióticos y bióticos, que incluyen el aire, el agua, el suelo, las plantas y los animales, y en el que la vida se mantiene a través de complejas interacciones entre ellos. El deterioro de cualquiera de sus componentes puede tener un serio efecto colateral en la continuidad de la vida.

Uno de los ecosistemas más vulnerables a la contaminación humana son los ecosistemas acuáticos, ya que constituyen uno de los principales focos de vertido. En ellos, los contaminantes se integran en un ciclo que incluye el agua, los sedimentos y los seres vivos, siendo estos últimos sobre los que se han observado principalmente los efectos de estos com-

puestos. El agua, esencial para la vida, se encuentra disponible de forma limitada y se ve sometida a una presión constante por la presencia de agentes infecciosos o productos químicos tóxicos que afectan a su calidad. El aumento de la demanda de agua potable así como la preocupación por la presencia en los ecosistemas acuáticos de compuestos contaminantes de origen antropogénico han dado lugar al desarrollo de diferentes normativas en todo el mundo para proteger este recurso. A nivel europeo existe la Directiva 2000/60/CE o Directiva Marco del Agua [1], una norma del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea que se desarrolló con el fin de proteger las aguas continentales, las aguas de transición, las aguas costeras y las aguas subterráneas. En ella se estableció el marco de actuación comunitario en el ámbito de la política de aguas en la Unión Europea, con los objetivos de prevenir y reducir la contaminación, promover el uso sostenible del agua, proteger el medio ambiente, mejorar la situación de los ecosistemas acuáticos y paliar las consecuencias de las inundaciones y de las sequías.

Un grupo de contaminantes presentes en los ecosistemas acuáticos son los clasificados como compuestos disruptores endocrinos (EDCs, *Endocrine Disrupting Chemicals*), los cuales pueden definirse como aquellas sustancias exógenas que alteran la función o funciones del sistema endocrino, produciendo efectos sobre la salud de los organismos sanos, en su descendencia o en las poblaciones [2]. Los EDCs son capaces de alterar el sistema hormonal, mimetizando a una hormona o bloqueando su acción, lo que produce la estimulación o la inhibición anormal del sistema endocrino (Figura 1). Este sis-

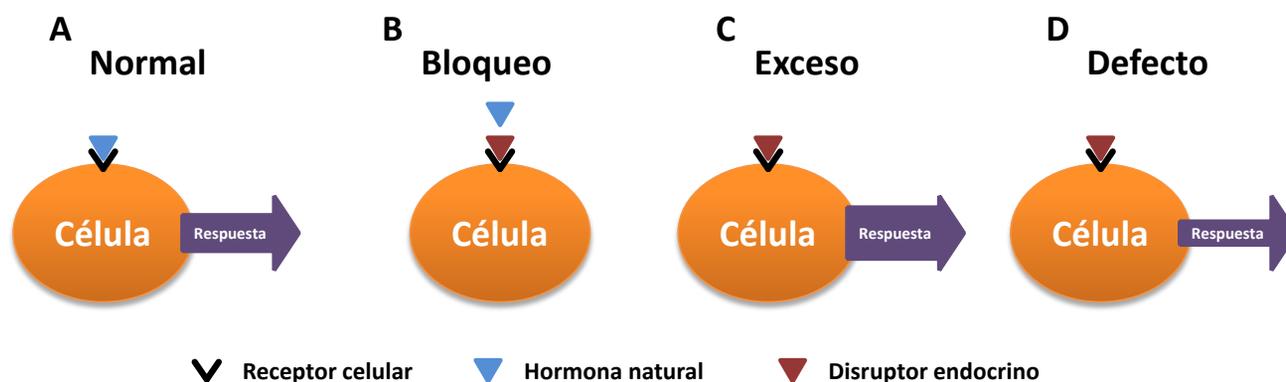


Figura 1. Modo de acción de un EDC. (A) Respuesta de la hormona natural. (B) Se produce el bloqueo del receptor por el EDC, impidiendo la unión de la hormona y la respuesta. (C). El EDC se une al receptor y produce una mayor respuesta que la que genera la hormona natural. (D) El EDC produce una menor respuesta que la hormona natural tras unirse al receptor.

tema es crítico para el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, la diferenciación sexual y la regulación de los procesos metabólicos.

En este sentido, el objetivo de esta tesis doctoral ha sido conocer los efectos a nivel molecular, bioquímico y celular de tres compuestos tóxicos catalogados como EDCs, como son el nonilfenol (NP), el triclosán (TCS) y el bisfenol A (BPA) (Figura 2) sobre larvas acuáticas del mosquito *Chironomus riparius* con la finalidad de identificar nuevos marcadores moleculares, bioquímicos y celulares de exposición a estos compuestos y que puedan ser empleados en la evaluación del daño que puedan ejercer los mismos sobre organismos invertebrados.

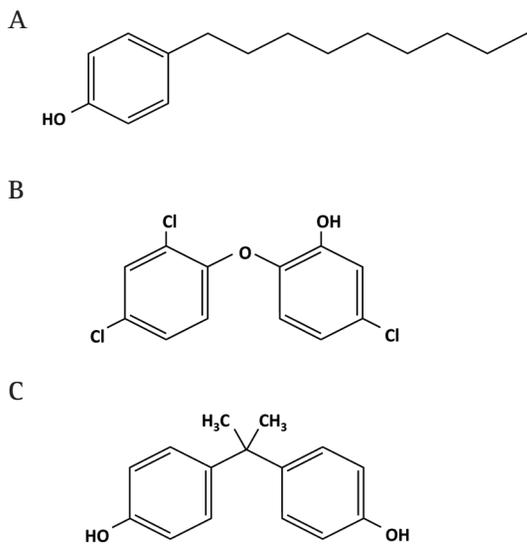


Figura 2. Fórmulas químicas de: (A) nonilfenol, (B) triclosán y (C) bisfenol A.

*C. riparius* es un díptero empleado como organismo de referencia en los ensayos de toxicidad acuática y como indicador de la calidad del agua, existiendo protocolos estandarizados para el desarrollo de estos ensayos con dicho insecto publicados por diferentes organismos, entre los que se encuentran la Agencia de Protección Medioambiental de los EE.UU. (USEPA, *United States Environmental Protection Agency*), la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos (OCDE, *Organization for Economic Co-operation and Development*) o la Sociedad Americana para el Ensayo de Materiales (ASTM, *American Society for Testing Materials*) [3-7]. El ciclo vital de este mosquito presenta las etapas de huevo, larva (con cuatro estadios), pupa y adulto, siendo todas acuáticas excepto la etapa de adulto (Figura 3). Las larvas de este mosquito viven asociadas a los sedimentos, donde se acumulan gran parte de los contaminantes; además, se encuentran en la base de la cadena trófica de los ecosistemas acuáticos, formando

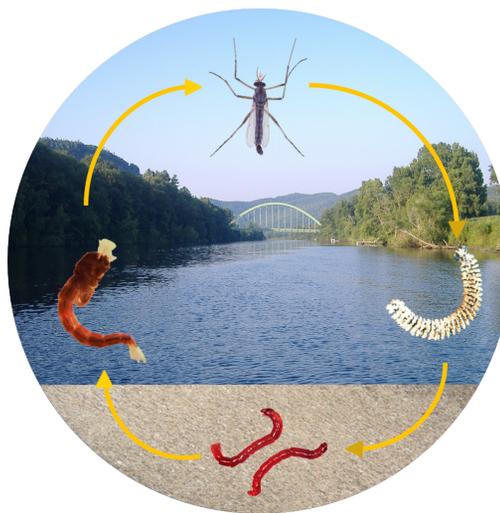


Figura 3. Ciclo de vida de *Chironomus riparius*. Las etapas de huevo, larva y pupa son acuáticas, mientras que la etapa de adulto es aérea.

parte de la alimentación de muchas especies acuáticas y terrestres.

La producción a nivel mundial de nonilfenol (NP) se estima en más de 200.000 toneladas al año [8], siendo su principal aplicación la producción de etoxilados empleados en la fabricación de detergentes de uso doméstico e industrial. Además se encuentra presente en pinturas, adhesivos, pesticidas y endurecedores de resinas epoxi y se emplea en la producción de papel y de productos cosméticos, así como en la industria textil. Por otro lado, también se usa en diferentes productos de laboratorio, en los agentes de curtido, como antioxidante en plásticos, como aditivo en los aceites lubricantes y en productos de limpieza de las ubres de vacas lecheras. El NP está incluido en la lista de sustancias peligrosas prioritarias de la Directiva Marco del Agua [1], actualizada por la Directiva 2013/39/UE [9], y su uso está actualmente regulado en la Unión Europea mediante la Directiva 2003/53/CE [10], aunque la producción y uso de los derivados de NP comenzaron a reducirse con la introducción voluntaria de diferentes acuerdos entre la industria y los gobiernos de los países de la Unión Europea [11]. Se ha estudiado el efecto del NP en organismos acuáticos, principalmente en peces, en los que se ha observado que es capaz de inducir la síntesis de proteínas características de las hembras, afectar a la morfología de los testículos y a la fertilidad en machos.

El triclosán (TCS) es un compuesto empleado como antibacteriano de amplio espectro en productos de cuidado personal, como son jabones, dentífricos, desodorantes y enjuagues bucales. Además, actualmente hay un aumento del número de productos que contienen triclosán, entre los que se encuentran

alfombras, bolsas de basura, juguetes para bebés y vajillas desechables. Como consecuencia de su amplio uso como agente antimicrobiano, el TCS ha llegado a ser un compuesto de distribución ubicua en los ecosistemas, además de haberse detectado en orina, plasma y leche humana. A pesar de que este xenobiótico está considerado como apto para su uso [12], se han descrito alteraciones a nivel de sistema endocrino producidos por el TCS en diferentes organismos, principalmente a nivel del sistema tiroideo en anfibios y en ratas.

El bisfenol A (BPA) es uno de los productos químicos más empleados en el mundo y con mayor volumen de producción, alcanzando 3,8 millones de toneladas al año [13]. Se encuentra clasificado en la lista europea como uno de los 564 potenciales disruptores endocrinos con el máximo nivel de riesgo (nivel III) y más recientemente se ha incluido en la lista prioritaria de los 66 compuestos de mayor riesgo. El BPA constituye el monómero del que se compone el plástico policarbonato, empleado en una gran variedad de productos industriales y de bienes de consumo de uso diario. Además se encuentra presente en las resinas epoxi que recubren el interior de multitud de recipientes y de envases destinados a estar en contacto con alimentos y bebidas con el fin de prevenir en ellos efectos de oxidación y corrosión, y en las resinas de poliéster. El BPA ha alcanzado gran interés por parte de la sociedad porque se ha demostrado que la principal vía por la que llega a nuestros cuerpos es a través de la alimentación, debido a que puede migrar desde los envases hasta los alimentos. Se ha demostrado que el BPA presenta actividad disruptora endocrina en numerosas especies de vertebrados, en las que provoca alteraciones en la reproducción y el desarrollo, en el sistema inmune y en el sistema nervioso.

A pesar de que se conocen los efectos que producen estos compuestos tóxicos sobre vertebrados, los estudios sobre organismos invertebrados son más limitados, por lo que resulta interesante analizar los efectos que dichos compuestos químicos producen sobre un díptero clave de los ecosistemas acuáticos.

Para evaluar los efectos del NP, el TCS y el BPA se expusieron larvas de *C. riparius* a diferentes tiempos y a concentraciones subletales, analizándose los cambios de expresión de diferentes genes y de una actividad enzimática seleccionados como posibles biomarcadores, los cuales pertenecen a diferentes procesos celulares:

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

Además, se evaluó el potencial genotóxico de cada compuesto mediante el ensayo cometa o electroforesis en gel de una única célula (SCGE, *Single Cell Gel Electrophoresis*), método empleado para la detección de bajos niveles de daño en el ADN y que permite su valoración de forma tanto cualitativa como cuantitativa en cualquier célula eucariota (Figura 4).

Debido a la escasa información sobre el genoma de *C. riparius*, una primera parte de este trabajo se centró en la secuenciación de tres genes y en la caracterización de las proteínas para las cuales codifican, ampliando así el número de genes disponibles para utilizarlos como posibles biomarcadores de exposición a compuestos tóxicos. Estos genes han sido

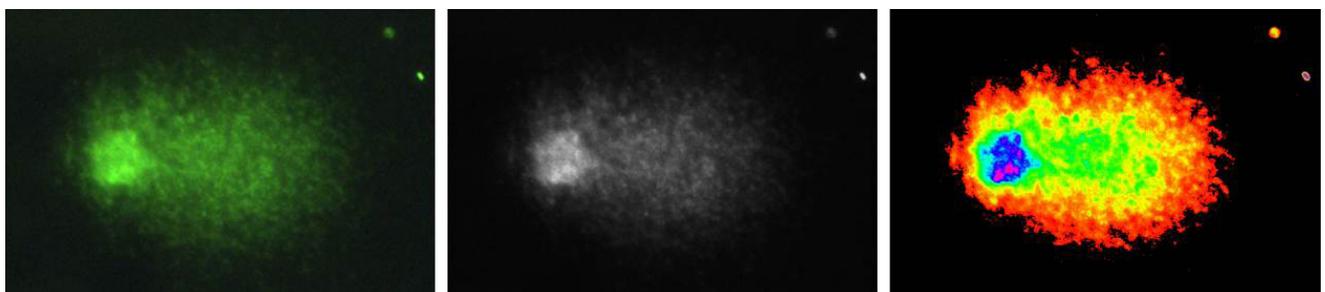


Figura 4. Imagen de una célula tras el ensayo cometa.

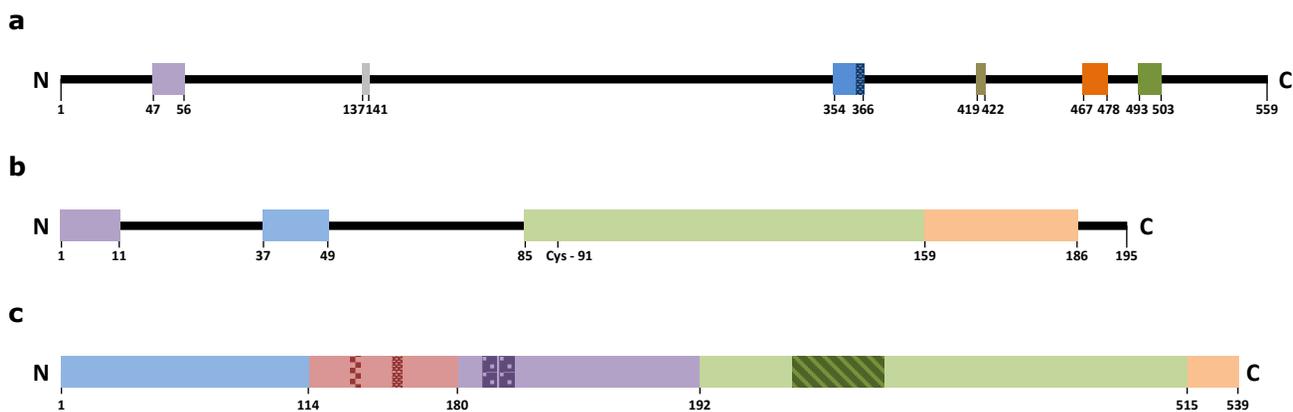


Figura 5. Mapa de los motivos conservados de las proteínas: (a) CYP4G: región P/G, PGPPTVPIIG, conservada en proteínas P450 (morado); hélice-C con su secuencia consenso WxxxR (gris); la secuencia EVDTFMFEGHDTT (azul) es característica de los CYP4, que incluye la hélice-I con la secuencia consenso GxE/DTT; la hélice-K, con la secuencia consenso ExxR (marrón); secuencia aromática característica de las proteínas P450  $A_1XPPXXA_2XPXBA_3$  (naranja); el motivo conservado PFXXGXRXCXG (verde) es la región de unión al hemo. (b) HSP27: el dominio amino-terminal está indicado en morado, el dominio característico de las proteínas HSP27s en azul, el dominio  $\alpha$ -cristalino en verde y el dominio carboxi-terminal en naranja. (c) EcR: El dominio conservado A/B está indicado en azul; el dominio conservado C (rojo) contiene una caja P (cuadrados rojos) y una caja D (punteado en rojo); el dominio conservado D (morado) contiene dos heptapéptidos (cuadrados morados) que actúan como señal de localización nuclear; el dominio E (verde) presenta un motivo cremallera hélice-giro (cuadrados verdes); el dominio F está indicado en naranja.

el gen *citocromo P450 (CYP4G)*, implicado en la ruta de detoxificación, el gen de la *proteína de choque térmico de 27 kDa (hsp27)*, incluido en la respuesta de estrés celular, y el gen *receptor de ecdisona (EcR)*, perteneciente a la ruta hormonal de la ecdisona (Figura 5).

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

Además, los resultados obtenidos demuestran la capacidad genotóxica de los tres compuestos a todas las concentraciones y tiempos estudiados, siendo especialmente relevante la dismi-

nución del daño en el ADN en exposiciones de 96 horas respecto a los tratamientos de 24 horas. Esto puede explicarse por la activación de los mecanismos de reparación del ADN y/o los mecanismos de detoxificación celular en tiempos largos de exposición.

## REFERENCIAS

- [1] Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de octubre de 2000 por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas.
- [2] IPCS (2002). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. International Programme on Chemical Safety (World Health Organization). Ginebra.
- [3] USEPA (1996). Ecological effects test guidelines, OPPTS 850.1790. Chironomid sediment toxicity test. EPA 712-C-96-313. United States Environmental Protection Agency. Washington DC.
- [4] USEPA (2000). Methods of measuring the toxicity and bioaccumulation of sediments associated contaminants with freshwater invertebrates, second edition. EPA 600/R-99/064. United States Environmental Protection Agency. Washington DC.
- [5] OCDE (2004). Guideline for testing of chemicals, sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment. Test No. 218. Organization for Economic Co-operation and Development. París.

- [6] OCDE (2011). OECD guideline for the testing of chemicals, section 2. Chironomus sp., acute immobilisation test. Test No. 235. Organization for Economic Co-operation and Development. París.
- [7] ASTM (2006). Standard test methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Book of Standards Vol. 11.06. American Society for Testing Materials. Philadelphia.
- [8] USEPA (2010). Nonylphenol (NP) and nonylphenol ethoxylates (NPEs) action plan. RIN 2070-ZA09. United States Environmental Protection Agency. Washington DC.
- [9] Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas.
- [10] Directiva 2003/53/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 18 de junio de 2003 por la que se modifica por vigesimosexta vez la Directiva 76/769/CEE del Consejo respecto a la limitación de la comercialización y el uso de determinadas sustancias y preparados peligrosos (nonylphenol, etoxilatos de nonilfenol y cemento).
- [11] OSPAR Convention (2000). PARCOM recommendation 92/8 on nonylphenol-ethoxylates. Londres.
- [12] USEPA (2008). Reregistration eligibility decision for triclosan. EPA 739-RO-8009. United States Environmental Protection Agency. Washington DC.
- [13] J. Michałowicz (2014). Bisphenol A - Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 37(2): 738-758.

Pedro José Martínez de Paz  
*Grupo de Biología y Toxicología Ambiental*  
*Dpto. de Física Matemática y de Fluidos*