

# Nuestra Facultad

## TESIS DOCTORALES

### EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS TOXICOGENÓMICOS Y GENOTÓXICOS DE LA VINCLOZOLINA EN INVERTEBRADOS ACUÁTICOS

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 [1]. Entre esos contaminantes existe una amplia diversidad de compuestos sintéticos que abarcan compuestos químicos industriales, productos fitosanitarios (herbicidas, insecticidas y fungicidas), 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 [2]. Un grupo de contaminantes son los denominados 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 [3]. Los compuestos catalogados como EDC son un grupo muy heterogéneo de sustancias que incluyen compuestos químicos sintéticos **ver Figura 1**. Los estudios realizados hasta el momento han permitido clasificar cada vez más sustancias con esta capacidad de interrupción endocrina, revelando que constituyen una seria amenaza para la salud humana, la fauna y los ecosistemas. Los EDCs son capaces de alterar el sistema hormonal, mimetizando a una hormona o blo-

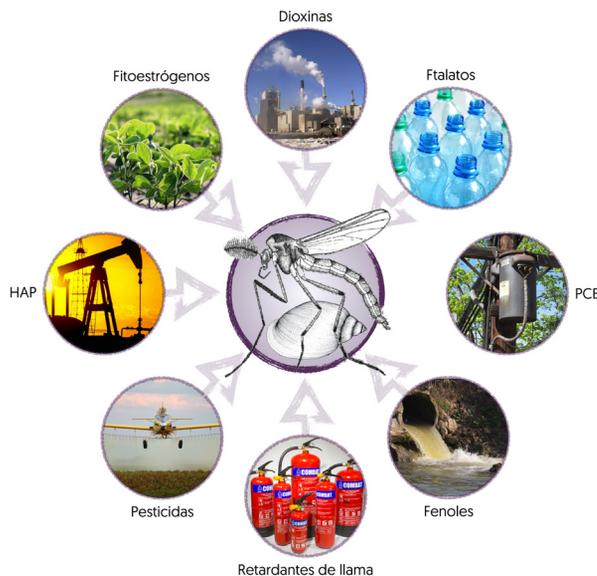


Figura 1. Ejemplos de sustancias consideradas como disruptores endocrinos. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), bifenilos policlorados (PCB).

queando su acción, lo que produce la estimulación o la inhibición anormal del sistema endocrino. Este sistema es crítico para el crecimiento, el desarrollo, la reproducción, la diferenciación sexual y la regulación de los procesos metabólicos. 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 (Vz)) y los fármacos (dietilestilbestrol, DES).

La Vz es un fungicida ampliamente usado con fines agrícolas en frutas, verduras, hortalizas y plantas ornamentales. Tanto la Vz como sus metabolitos, el ácido butanoico (M1) y enalidina (M2), tienen la capacidad de actuar como compuestos antiandrogénicos [4] 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 [5]. 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 [6] (EPA Office of Pesticide Programs, 2000; US-EPA, 2000). Investigaciones recientes han demostrado que la Vz es capaz de interferir en el sistema endocrino de distintos organismos, principalmente vertebrados, pudiendo causar daños en la fertilidad y afectar a generaciones futuras, dado que se han descrito efectos transgeneracionales, mediante alteraciones en el epigenoma [7, 8, 9]. Por otro lado, la ECHA (del inglés European Chemicals Agency) ha clasificado la Vz como tóxica para la vida acuática con efectos a largo plazo. Sin embargo, y como ocurre de manera frecuente, los estudios en invertebrados son muy limitados a pesar de que forman la base de los ecosistemas acuáticos.

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 [10]. Son uno de los elementos clave en la cadena trófica de estos ecosistemas [11] al ser un componente importante de la dieta de numerosas especies de peces y aves acuáticas. 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. Tras una metamorfosis controlada hormonalmente, que permite un cambio drástico morfológico y fisiológico, se convierten en adultos aéreos **ver Figura 2**. Los adultos, que son la fase en-

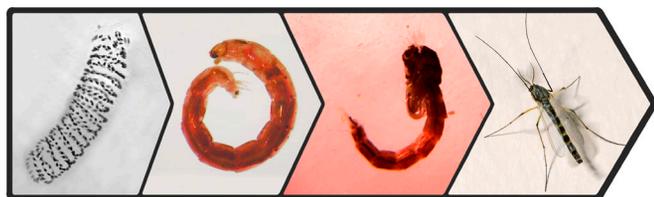


Figura 2. Ciclo de vida de *C. riparius*. Las imágenes representan distintas etapas del mismo. De izquierda a derecha: masa de huevos, larva de cuarto estadio, pupa y un mosquito adulto.

cargada de la reproducción, emergen de 15 a 17 días tras la eclosión y viven en torno a cuatro días.

Por otro lado, 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. La duración de su ciclo de vida en condiciones de laboratorio es de 5 a 6 meses [12], considerándose que alcanzan la madurez sexual tras la primera ovoposición, a las diez semanas **ver Figura 3**.



Figura 3. Ciclo de vida de *P. acuta*. Las imágenes representan distintas etapas del mismo.

De izquierda a derecha, embriones, un juvenil, y un adulto.

Ambos organismos se emplean en los estudios de ecotoxicidad acuática y como indicadores biológicos de la calidad del agua al ser considerados como organismo de referencia.

El objetivo general de la tesis doctoral, ha sido evaluar el efecto toxicogénico y genotóxico de la Vz en invertebrados acuáticos. Se ha demostrado que la Vz actúa como disruptor endocrino con actividad anti-androgénica en mamíferos, así mismo se han descrito sus efectos en la reproducción de organismos acuáticos (peces e invertebrados), aunque no se conoce el mecanismo de acción en estos últimos. El estudio de los efectos toxicogénicos 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, respuesta celular de estrés, metabolismo de xenobióticos y mecanismos de reparación del. Este último (estudio toxicogénico sobre mecanismos de reparación del ADN) se completó con el ensayo cometa para conocer el daño en el ADN. 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.

Los resultados obtenidos, han demostrado que 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 diversos genes y, al mismo tiempo, modificando el metabolismo de la ecdisona. Sin embargo, el sistema hormonal de *P. acuta* 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 genes relacionados con estrés celular. Además de la activación de mecanismos de detoxificación. Nuevamente, *P. acuta* mostró un comportamiento diferente ya que se observó la inhibición de un gen relacionado con estrés celular 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. Por último, la sobreexpresión de genes involucrados en mecanismos de reparación del ADN 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 los genes homólogos.

En el presente trabajo, 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.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Geissen V, Mol H, Klumpp E, Umlauf G, Nadal M, van der Ploeg M, van de Zee SEATM, Ritsema CJ (2015). Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *Int. Soil Water Conserv. Res.* **3**, 57–65.
- [2] Murnyak G, Vandenberg J, Yaroshak PJ, Williams L, Prabhakaran K, Hinz J (2011). Emerging contaminants: presentations at the 2009 Toxicology and Risk Assessment Conference. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **254**, 167–9.
- [3] Barouki R (2017). Endocrine disruptors: Revisiting concepts and dogma in toxicology. *C. R. Biol.* **340**, 410–413.
- [4] Kelce WR, Wilson EM (1997). Environmental antiandrogens: developmental effects, molecular mechanisms, and clinical implications. *J. Mol. Med. (Berl)* **75**, 198–207.
- [5] Bilal M, Iqbal HMN (2019). An insight into toxicity and human-health-related adverse consequences of cosmeceuticals A review. *Sci. Total Environ.* **670**, 555–568.
- [6] EPA Office of Pesticide Programs U, (2000). US EPA - Pesticides - Fact Sheet for Vinclozolin. Environmental Protection Agency, California.
- [7] Casati L, Sendra R, Sibilía V, Celotti F (2015). Endocrine disruptors: the new players able to affect the epigenome. *Front. Cell Dev. Biol.* **3**, 37.
- [8] 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.

- [9] McCarrey JR, Lehle JD, Raju SS, Wang Y, Nilsson EE, Skinner MK (2016). Tertiary Epimutations - A Novel Aspect of Epigenetic Transgenerational Inheritance Promoting Genome Instability. *PLoS One* **11**, e0168038.
- [10] Rasmussen JB (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.
- [11] Berg MB, Hellenthal RA (1992). The role of Chironomidae in energy flow of a lotic ecosystem. *Netherlands J. Aquat. Ecol.* **26**, 471-476.
- [12] Sánchez-Argüello P, Fernández C, Tarazona JV (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.

Mónica Aquilino Amez

Grupo de Biología

Dpto. de Física Matemática y de Fluidos