



Desenvolupament de tècniques moleculars avançades per la monitorització de l'impacte per microcontaminants

Sergi Pelayo Martinez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Facultat de Farmàcia

Departament de Bioquímica
i Biologia Molecular

Institut de Diagnòstic Ambiental
i estudis de l'aigua

Departament de Química Ambiental

**DESENVOLUPAMENT DE TÈCNIQUES MOLECULARS
AVANÇADES PER LA MONITORITZACIÓ DEL IMPACTE PER
MICROCONTAMINANTS**

Tesis doctoral
Sergi Pelayo Martinez
2012

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA
Programa de Doctorat en Biotecnologia
Bienni 20011-2013

**DESENVOLUPAMENT DE TÈCNiques MOLECULARS
AVANÇADES PER LA MONITORITZACIÓ DEL IMPACTE PER
MICROCONTAMINANTS**

Memòria presentada per

Sergi Pelayo Martinez

Per optar al grau de

Doctor per la Universitat de Barcelona

Director:

Dr. Benjamí Piña Capó
Investigador Científic de l'Institut de Diagnòstic ambiental i estudis de l'Aigua

Sergi Pelayo Martinez:

Als meus Pares

*L'important es veure el que resulta invisible
per als altres.*

Robert Frank

AGRAÏMENTS

Escriure sempre m'ha resultat difícil i aquest text no ha estat pas una excepció. Han estat moltes hores d'escriptura, moltes hores en blanc i moltes hores rumiant sobre com expressar sobre el paper el que volia transmetre. Aquest apartat, sense dubte, és totalment diferent, aquí no hi ha estadística, densa bibliografia ni ordenadors que se saturen i es bloquegen. Només hi ha les ganes d'expressar el meu agraïment a tots aquells que m'han acompanyat durant aquestos últims 5 anys.

Primer de tot, vui agrair al Dr. Benjamí Piña, director de la tesis, que m'ha orientat i donat la oportunitat d'entendre molt millor com funciona tot això dels gens, proteïnes i l'adaptació al medi, realitzant un projecte que m'ha permès intentar millorar una mica l'entorn que ens envolta. També agrair a l'equip de Cetaqua i R+Alliance per poder participar en els seus projectes mediambientals.

A la Dra. Laia Quiròs que, amb una paciència infinita, em va iniciar en les tècniques moleculars i els protocols per al bon funcionament d'un laboratori sempre amb la millor disposició per ensenyar.

A la Marta Casado (la Subjefa!) que m'ha ajudat moltíssim aportant idees quan jo no en tenia. Tots els que coneixeu a la Marta us imaginareu que el seu caràcter no li ha permès participar en la meva tesi únicament de forma instructiva i han estat masses estones divertides, masses dinars i masses cafès rient amb ella com per no agrair-li.

Com no, a l'Anna i l'Alba. Que puc dir? Sabeu perfectament que per mi compartir el laboratori amb vosaltres ha estat un de les millors experiències que he tingut. No només per forçar i estimular el meu cervell per entendre les vostres converses a vegades estranyes, esbrinar on s'amaguen les meves estisores i marcadors o participar activament en el disseny del nostre gran amic meneitos, sinó per tot el que hem compartit al llarg d'aquests anys i que em fa recordar el meu treball al laboratori amb un somriure als llavis. Us trobaré a faltar.

A la Dra. Maria, (Aka Pidolareeee), per ensenyar-me que hi ha més vida lluny de la capital i adoptar-me al seu laboratori amb la Marlene i la Mariette en aquells temps infernals d'incubació.

A la coffe team, Ripol i Eva P. M'ha encantat solucionar el món amb vosaltres i he après moltíssim de vosatres. Suposo que sabeu que trobaré a faltar aquests debats sobre les editorials del NY Times i comentar la jugada dels últims gadgets comercialitzats.

A los demás compañeros del laboratorio, pasillos y cafés: Eva O., Vicky, Bene, Melisa, Joana, Kaothar, Ali, Giorgio, Marí Carmen, Dania, Bruno, Claudia, Denisse, Sabine, Bárbara, Silvia, Sophie, Philou y como no la Solecita, he compartido caipirinhas, pasteles, y un largo etcera que me ha echo pasar unos grandes momentos con vosotros.

Pel final m'he deixat totes aquelles persones que, tot i no saber exactament que és una qrt-PCR, han estat indispensables per acabar. Primer de tot els meus Pares que m'han recolzat des del principi fins al final i sobretot en l'última etapa donant-me ànims i tot el que he necessitat quan més ho necessitava. Moltíssimes Gràcies!

A la meva germana i al Dídac per ser els primers correctors de word, que a més de corregir faltes ortogràfiques i gramaticals, et deixen el nebot per gaudir d'ell. Mòltes gràcies per l'ajuda entre les calors de l'agost i els nervis dels últims moments. A l'Isaac, que tot i la seva inconsciència típica d'un nen de 5 anys, m'ha ajudat a repassar els temes de toxicologia ambiental entre jocs i visites a l'aquàrium.

Com no, als meus amics Marcos (i la seva gran frase "los colegas estan para esto"), Nieto, Marta, Eva, Jordi (The Half Trickman), Bernats, Lluís, J.Goy, J.Kalvo, Klm, Mariona, Guille i tots aquells que els últims mesos han estat molt pendents de mi i han estat allà per prendre una bona cervesa quan la necessitava, un 23 o un Dubstep per desfogar-me quan em veien amb cara de circumstàncies o fer una bona partida friki quan volia dedicar el meu cervell coses no molt científiques.

Moltes Gracies a tots!

ÍNDEX

1.INTRODUCCIÓ

1.1 Toxicologia Ambiental.....	11
1.2. Els Contaminants com a xenobiòtics.....	12
1.2.1. El Bisfenol A.....	13
1.2.2. Metalls pesants	15
1.2.2.1 Mercuri.....	15
1.2.2.2 Plom	16
1.2.2.3 Cadmi.....	17
1.2.3. Compostos organoclorats	18
1.2.3.1.DDT i Derivats.....	18
1.2.3.2.Bifenils Policlorats (PCB)	20
1.2.3.3.Hexaclorocicloxans (HCH)	21
1.2.3.4.Hexaclorobencè (HCB)	22
1.2.4.Hidrocarburs Aromàtics Policíclics (PAHs)	22
1.3 Metabolisme i acció dels xenobiòtics.	25
1.3.1 Bioacumulació i biomagnificació	26
1.3.2. Els xenobiòtics i les hormones.....	26
1.3.2.1 Els disruptors endocrins.....	29
1.3.3 Els receptors nuclears com a molècula diana dels xenobiòtics.	30
1.3.4. Els Xenobiòtics i la disrupció tiroïdal.....	32
1.3.4.1. L'eix tiroïdal.....	32
1.3.4.2 El receptor de l'hormona tiroïdal:	33
1.3.4.3. La regulació enzimàtica de l'eix tiroïdal mitjançant: Les Deiodinases..	34
1.3.4.4.Disruptors tiroïdals	35
1.3.4.4.1 Canvis en la síntesi o secreció de l'Hormona Tiroïdal.....	36
1.3.4.4.2 Alteracions en les proteïnes de transport i de captació cel·lular	37
1.3.4.4.3 Xenobiòtics que interaccionen amb els TRs o la seva expressió	37

1.3.4.4.4 Alteració de la funció de les Deiodinases i del Metabolisme de l'Hormona Tiroïdal.	37
1.4 Espècies sentinella:	38
1.4.1 <i>Danio rerio</i>	38
1.4.1.1 Desenvolupament embrionari de <i>Danio rerio</i> :.....	39
1.4.1.2. L'Eix Tiroïdal de <i>Danio rerio</i> al llarg del desenvolupament	44
1.4.1.3. Desenvolupament i funció de les escates.	45
1.4.1.4. Transport d'oxigen i sistema sanguini :.....	47
1.4.1.4.1. Globulines	47
1.4.1.5. Sistema visual.....	48
1.4.1.6. Receptor d'estrògens a <i>Danio rerio</i>	52
1.4.1.7. Processos involucrats en el metabolisme dels xenobiòtics a <i>Danio rerio</i>	52
1.4.1.7.1. Citocrom Cyp1a a <i>Danio rerio</i>	53
1.4.1.7.2. Les Metal·lotioneïnes a <i>Danio rerio</i>	55
1.4.8. Metabolisme lipídic a <i>Danio rerio</i>	57
1.4.2 <i>Cyprinus carpio</i>	59
1.4.3. <i>Ardea purpurea</i>	60
1.4.3.1 Detecció d'elements genotòxics en aus	61
1.4.3.2. Els micronuclis com a biomarcadors en <i>Ardea purpurea</i>	61
1.5. Bioassaigs i tècniques de monitorització ambiental	63
1.5.1 Els bioindicadors i biomarcadors:	65
1.5.2 PCR quantitativa en temps real.....	66
1.5.2.1. Quantificació de l'expressió gènica	67
1.5.3. Hibridació mitjançant chips de DNA (Microarrays):	70
1.5.3.1. Volcano Plot	70
1.5.3.2. Recursos online (Gene Ontology i Zebrafish Information Network).....	71

1.5.4. Citòmetre de Flux:	72
2.OBJECTIUS	73
3. MATERIALS I MÈTODES	77
3.1 La Conca del Riu Llobregat:.....	79
3.1.1.La Mina Pública.....	79
3.1.2.Sant Joan Despí:.....	80
3.1.3.Molins de Rei - Tub Governador:.....	80
3.2 El riu Roine (Roine-Alps, França).....	81
3.3 La Conca del riu Ebre	82
3.3.1.Embassament de Riba-roja:	82
3.3.2.Embassament de Flix.....	82
3.3.3.Ascó	83
3.3.4.Xerta	83
3.3.5.El Delta de l'Ebre	83
3.4. Manteniment de Zebrafish en estabulari i processos d'exposició	84
3.4.1 Protocol d'exposició en <i>Danio rerio</i> per l'Anàlisi d'esctaes	84
3.4.2. Exposició de <i>Danio rerio</i> en fase embrionària	84
3.4.3 Estudis de toxicitat (ISO 15088).....	85
3.5. Extracció mRNA pel protocol Trizol® Cloroform.....	86
3.6. Extracció de mRNA pel protocol RNeasy® Kit (Qiagen) + CellAmp™ Whole Transcriptome Amplification Kit (Takara).....	87
3.7. Gens de referència	87
3.8. Clonatge i seqüenciació de bandes	88
4. FACTORS D'IMPACTE	89
5.RESULTATS	97
5.1 CAPÍTOL 1: Estandardització i aplicació del bioassaig per testar mostres d'origen ambiental per tal d'estudiar el seu impacte en quant a compostos tipus dioxina a les zones de mostreig.	97

Article 1. Assaig en escames de peix zebra per a la monitorització de l'activitat dioxina en aigües superficials.	99
Article 2: Anàlisi biològic i químic integrat de la contaminació per compostos organoclorats i els seus efectes biològics en un sistema fluvial aigües avall del punt de descarrega.	121
5.2 CAPÍTOL 2: Estudi dels efectes subletals dels disruptors tiroïdals en els primers estadis del desenvolupament a <i>Danio rerio</i>	149
Article 3. Canvis induïts per la Triiodotironina en el transcriptoma de Zebrafish durant la fase embrionària. Implicacions del Bisfenol A en la toxicitat en el desenvolupament.	151
6.DISCUSSIÓ GLOBAL	175
Capítol 1. Estandardització i aplicació del bioassaig per testar mostres d'origen ambiental per tal d'estudiar el seu impacte en quant a compostos tipus dioxina a les zones de mostreig.....	178
6.1 Estudi de l'impacte ambiental per activitat tipus dioxina a l'embassament de Flix i part baixa del riu Ebre.....	178
6.1.1. Expressió de <i>Cyp1a</i> en <i>Cyprinus carpio</i> per a la detecció de compostos organoclorats a l'embassament de Flix.....	178
6.1.2 Estudi dels contaminants organoclorats de la zona de Flix sobre <i>Ardea purpurea</i> i els seus efectes genotòxics:	181
6.2 Assaig en escames de peix zebra per a la monitorització de l'activitat dioxina en aigües superficials (Article 1).	185
6.2.1 Validació i estandardització de bioassais no letals basats en <i>Danio rerio</i> per la detecció de Compostos amb Activitat Dioxina, Metalls Pesants, Disruptors endocrins.....	185
6.2.2 Validació del protocol d'Amplificació mitjançant CellAmp™ i comparació dels resultats obtinguts amb la metodologia clàssica.....	189
6.2.3 Monitorització ambiental del tram baix del riu Llobregat mitjançant escames de <i>Danio rerio</i>	191

6.3. Canvis induïts per la Triiodotironina en el transcriptoma de Zebrafish durant la fase embrionària.Efectes sobre el metabolisme lipídic i implicacions del Bisfenol A en la toxicitat durant el desenvolupament.	199
6.3.1 La Disrupció tiroïdal i els seus efectes sobre el metabolisme lipídic en eleuteroembrions de <i>Danio rerio</i> . Efectes del fàrmac Amiodarona sobre el correcte desenvolupament del sistema tiroïdal.	199
6.3.2 Transcriptoma i efectes fenotípics durant el desenvolupament embrionari de <i>Danio rerio</i> (Article 3).	204
6.3.3 Efectes dels fàrmacs disruptors tiroïdals Amiodarona i Metimazol sobre el sistema visual i hematopoètic de <i>Danio rerio</i>	209
6.3.4 Efectes del BPA en el Sistema Tiroïdal de <i>Danio rerio</i> (Article2).....	211
8.CONCLUSIONS	216
9.BIBLIOGRAFIA	221

ABREVIATURES

ABREVIATURES

AF: Domini d'activació transcripcional (*Activation Domains*)

AG: Àcids grassos

AhR: Receptor d'hidrocarburs d'Aril (*Aryl hydrocarbon Receptor*)

ARÈ: Antioxidant Response Element

ARNt: AhR nuclear translocator

BFB: Breakage fusion bridge

β -NF: β -Naftoflavona

BPA: Bisfenol A

cDNA: DNA Complementari (*Complementary DNA*)

COPs: Contaminants Orgànics Persistents

Cq: Cicle de quantificació

Ct: Cicle llindar (*Cycle threshold*)

CYP: Citocrom P450

DBD: Domini d'Unió al DNA (*DNA Binding Domain*)

DC: Cons Dobles (*Double Cones*)

DDA: 2,2-bis(4-Clorofenil)-Acètic

DDE: 2,2-bis(p-clorofenil)-1,1-dicloretila

DDT: 1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-età

DEPC: Dietil Pirocoarbonat

DPF: Dies post fertilització

EEA: European Environmental Agency

EPA: Agència de Protecció mediambiental (*Environmental Protection Agency*)

ER: Receptor d'Estrogen (*Estrogen Receptor*)

ERE : Element Resposta a Estrògens (*Estrogen Response Element*)

FABP: Fatty Àcid Binding Protein

GO: Gene Ontology HAH: Hidrocarburs Aromàtics Halogenats

HCB: Hexaclorobenzè

HCH: Hexaciclohexà

hpf: Hores post fertilització

Hsp90: Heat shock Protein

IARC: Agency for Research on Càncer

ICM: Massa cel·lular intermèdia (*Intermediate Cell Mass*)

ISO: International Organization for Standardization

LBD: Domini d'Unió a Lligand (*Ligand Binding Domain*)

LC₅₀: Concentració Letal al 50% (*Lethal Concentration at 50%*)

LSC: Cèlula tipus con llarg simple (*Long Single Cone*)

LWS: Long Wave Sensitive Opsin

MN: Micronucli

MRE: Element de Resposta a Metalls (*Metal Response Element*)

MT: Metal·lotioneïna

MTP: Microsomal Triglyceride Transfer Protein

MTF-1: MRE-Binding Transcriptional Factor-1

N-COR: Nuclear Corepressor

NES: Seqüència d'Exportació Nuclear (*Nuclear Exportation Sequence*)

NLS: Seqüència de Localització Nuclear (*Nuclear Location Sequence*)

OC: Compostos Organoclorats (*Organochlorine Compounds*)

OMS: Organització Mundial de la Salut

p23: Prostaglandina E-Sintasa 3

PAH: Hidrocarburs Aromàtics Policíclics (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*)

PCB: Policlorobifenil

PCP : Pentaclorofenol

PCR: Reacció en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

POP: Contaminants Orgànics Persistents (*Persistent Organic Pollutants*)

PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor

PVC: Clorur de Polivinil

qPCR: Reacció en Cadena de la Polimerasa quantitativa (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

REF: Referència

RGM: Reactive Gaseous Mercury

RH1: Rodopsina

ROS: Espècies Reactives d'Oxigen (*Reactive oxygen species*)

RXR: Receptor X Retinòic (*Retinoid X receptor*)

SMRT: Silencing Mediator For Retinoic and Thyroid Hormone Receptors

SSC: Cèl·lula tipus con curt simple (*Short Single Cone*)

SWS: Short Long Wave Sensitive Opsin

T3: Triiodetironina

T4: Tiroxina

TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

TDC: Contaminats Disruptors Tiroïdals (*Thyroid Disrupting Chemicals*)

TEF: Factor Equivalència Tòxica (*Toxic Equivalence Factor*)

TG: Triglicèrids

TH: Hormona Tiroïdal.

TR: Receptor Tiroïdal (*Thyroid Hormone Receptor*)

TRE: Element de Resposta a Hormona Tiroïdal (*Thyroid Hormone Response Elements*)

TTR: Transtiretina (*Transthyretin*)

UDPGT: UDP-glucuronosyltransferase

UNEP: Programa de Mediambient de les Nacions Unides (*United Nations Environmental Programme*)

XAP: Xaperona

XRE: Element de Resposta a Xenobiòtics (*Xenobiotic Response Element*)

WHO: World Health Organization

1.INTRODUCCIÓ

1.1 Toxicologia Ambiental.

La toxicologia ambiental és la ciència que estudia els efectes adversos que causen els contaminants sobre els organismes o el medi biòtic, mitjançant l'anàlisi dels seus mecanismes d'acció, transport, metabolisme i/o destoxificació. Això permet valorar la seva repercussió en els organismes i en la totalitat de l'ecosistema de manera integrada. Aquesta avaluació és ara més necessària que mai, degut al fort impacte de la civilització actual sobre el medi que l'envolta.



El medi aquàtic és un dels recursos més importants per l'home, tant per la seva aportació a l'alimentació (aigua potable, pesca, usos agropecuaris) com per la seva utilitat en els processos industrials. Aquest paper fonamental en el desenvolupament humà, lligat a l'augment poblacional i a un major esgotament dels recursos, ha provocat, i segueix provocant, un desequilibri en els ecosistemes aquàtics. Des dels segles XIX i XX, el nombre de substàncies abocades al medi aquàtic que poden tenir un efecte negatiu, tant pel propi ecosistema com per l'home, ha crescut de manera exponencial. Els avenços tecnològics en la indústria química han generat un increment de la seva diversitat estructural, el que comporta un augment exponencial dels seus potencials efectes perjudicials, fins i tot a concentracions molt baixes.

Als últims anys, la preocupació mundial per l'impacte dels contaminants químics sobre els ecosistemes ha impulsat la creació de diversos organismes encarregats d'establir les

normatives necessàries per limitar la presència de determinats compostos al medi. L'any 1993, a la Comunitat Europea es va crear l'European Environmental Agency (EEA) i, més recentment, l'European Chemicals Agency (Dechaud, Ravard et al.) amb la funció de vetllar pel compliment de la normativa REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals). Aquesta normativa es va posar en vigor l'any 2007 i té com a principal funció sospesar la protecció del medi ambient amb el manteniment de la competitivitat i la innovació de la indústria química europea.

1.2. Els Contaminants com a xenobiòtics

La contaminació és l'alteració de les propietats d'un medi per incorporació, generalment deguda a l'acció directa o indirecta de l'home, materials, ones o radiacions que introdueixen modificacions a l'estructura i la funció dels ecosistemes afectats.

En els nostres estudis ens hem centrat en els efectes dels contaminants anomenats xenobiòtics. La paraula xenobiòtic prové de la combinació de les paraules del grec xenos= estranger i bios= vida. Es refereix a tot producte químic que es troba en un organisme, però que normalment no s'hi produeix ni s'espera la seva presència. També s'engloben dins d'aquesta denominació aquelles substàncies químiques naturals trobades als ecosistemes i organismes en concentracions molt superiors als seus nivells fisiològics.



La toxicitat potencial dels xenobiòtics ve determinada per les seves capacitats de dispersió, concentració, transport i transformació. En el present treball tenen especial transcendència els processos de biotransformació, fenomen sofert per les substàncies absorbides pels éssers vius al ser metabolitzades per donar lloc a diferents metabòlits, que poden ser innocus com inclús més tòxics que la substància original.

Els xenobiòtics presents en els ecosistemes aquàtics poden ser classificats segons la seva estructura, composició química, el seu origen o les seves característiques

fisicoquímiques. Al llarg d'aquest treball hem centrat la nostra atenció en els efectes fisiològics produïts pels Bisfenol A, els compostos organoclorats, els compostos policíclics aromàtics i els metalls pesants, per tal de relacionar-los amb la seva presència en el medi aquàtic i els seus possibles efectes.

1.2.1. El Bisfenol A

Els productes plàstics són indispensables per la nostra societat moderna, incloent aplicacions sanitàries (xeringues, bosses intravenoses, etc..) i alimentàries. Malauradament, molts d'ells presenten diverses activitats biològiques no volgudes que poden afectar a la salut humana i mediambiental. La seva producció en massa es va iniciar a finals els anys 40 i actualment hi ha més de 20 grups de productes plàstics ben diferenciats. La seva producció anual total és impossible de calcular amb precisió, tot i que s'estima que l'any 2010 va superar els 300 milions de tones (Halden 2010).

El Bisfenol A (BPA) és el monòmer utilitzat per produir els plàstics policarbonats, tot i que també s'utilitza com additiu d'altres plàstics com el PVC (Halden 2010). Va ser sintetitzat per primera vegada el 1891 (Halden 2010) i actualment se'n produeixen aproximadament uns 2.2 milions de tones mètriques. És un element comú en la fabricació de productes com biberons, botelles d'aigua, etc. i sovint es troba en contacte directe amb productes alimentaris. A més, la polimerització del BPA pot deixar monòmers lliures que poden ser alliberats als aliments continguts en els seus embalatges, un procés que pot ser accelerat a altes temperatures (Kang, Kito et al. 2003) si

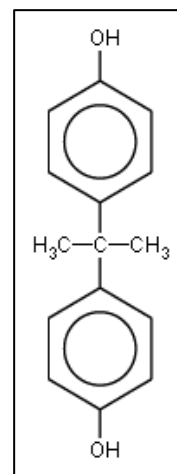


Figura 1. Estructura molecular del BPA.

els contenidors són rentats amb freqüència o quan el contingut té un caràcter àcid o bàsic capaç de trencar el polímer (Halden 2010).

L'alimentació es considera el factor principal de contaminació per BPA de la població humana, però també s'ha de tenir en compte que la producció d'aquest compost provoca l'alliberament de més de 100 tones anuals de BPA a l'atmosfera. Diversos estudis epidemiològics demostren que aquestes diferents formes d'alliberar el BPA al medi han comportat la seva introducció a la totalitat de la cadena tròfica. En humans, la concentració de BPA en sang oscil·la entre 0,1 i 10µg/l als països industrialitzats

(Ikezuki, Tsutsumi et al. 2002; Schonfelder, Wittfoht et al. 2002). A més, el BPA té una alta capacitat de difusió; en dones en gestació, els seus nivells són iguals en el líquid amniòtic que en sang, demostrant la seva capacitat d'afectar als individus en els seus primers estadis de desenvolupament (Kuruto-Niwa, Tateoka et al. 2007). Finalment, un estudi dirigit pel *Centers for Disease Control and Prevention* (EUA) demostra que el 95% de l'orina dels americans adults presenta traces de BPA (Halden 2010).

Tot i l'elevada presència del BPA en el nostre entorn, els seus efectes adversos sobre la salut segueixen aixecant debat després de setanta anys d'estudi. L'activitat estrogènica



del BPA ja va ser descrita l'any 1936 (Kuruto-Niwa, Tateoka et al. 2007) i, actualment, es classifica com un agent que pot imitar l'acció dels estrògens degut a la seva capacitat d'interaccionar amb els receptors $ER\alpha$ i $ER\beta$, tot i que amb una afinitat unes 10.000 vegades

menor que la del lligand natural (Vandentorren, Zeman et al. 2011). Altres estudis assenyalen el BPA com un possible lligand de diferents receptors d'esteroides de membrana i com un possible disruptor del desenvolupament mitjançant la interacció amb les vies metabòliques regulades per l'hormona tiroïdal (Heimeier, Das et al. 2009). Finalment, diversos estudis epidemiològics han trobat una relació entre els nivells sanguinis de BPA en dones i obesitat, hiperplàsia, esterilitat i d'altres (Bern, Mills et al. 1983). Per tot això, la U.S. EPA ha establert en $50\mu\text{g}/\text{Kg}$ al dia com la màxima dosi de referència pels humans (Halden 2010), quantitat que actualment es considera massa elevada.

Els efectes del BPA sobre la fauna varien molt depenent de l'animal d'estudi. S'han pogut observar efectes estrogènics i constatar efectes teratogènics, encara que a concentracions molt superiors a les trobades en el medi. Els efectes estrogènics sobre els vertebrats són molt variables i van des del desenvolupament sexual anormal en peixos, amfibis, rèptils i ocells a concentracions altes de BPA, a alteracions en la funció de les gònades a concentracions més baixes en tots els vertebrats estudiats. Un exemple

d'aquests efectes és la reducció del recompte d'espermatozous en mascles de *Pimephales promelas* exposats a $16\mu\text{g/l}$ de BPA (Staples, Tilghman Hall et al.) i retards a l'ovulació en femelles d'*Oryzias latipes* exposades a $2,4\mu\text{g/l}$ de BPA (Kang, Yokota et al. 2002).

1.2.2. Metalls pesants

Tot i que no existeix una definició oficial, entenem com metall pesant tots aquells elements metàl·lics que presenten una elevada densitat ($> 4,5 \text{ gr/cm}^3$). Dins d'aquest grup tenim metalls que són essencials per molts processos metabòlics, donat que formen part del nucli actiu d'alguns enzims. Tant els essencials com els no essencials poden resultar tòxics pels éssers vius depenent de la concentració. Els metalls pesants tòxics més coneguts són el Mercuri (Hg), el Cadmi (Cd) i el Plom (Pb) (Dluzen and McDermott 2004).

1.2.2.1 Mercuri

L'interès pels efectes del mercuri sobre la salut humana van iniciar-se després de la mort de 45 persones en la Badia de Minamoto (Japó). Els pescadors, les seves famílies i fins i tot els seus animals domèstics van patir un afebliment generalitzat dels músculs, deficiències en la visió i retard mental. La font de contaminació provenia de les indústries properes productores de clorur de polivinil (PVC) que abocaven a la badia

una gran quantitat de compostos derivats del mercuri, com el etilmercuri ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$).



El Hg s'ha utilitzat des de l'antiguitat per a l'extracció d'or i plata i en la confecció de miralls. Actualment s'utilitza en instruments de mesura,

endolls, fluorescents, com a catalitzador, en la indústria d'explosius, per la combustió

del carbó en centrals elèctriques, en amalgames dentals i com a conservant en vacunes (van Veizen, Langenkamp et al. 2002). Tot i que les emissions produïdes per l'home són molt importants, s'ha de tenir en compte que una tercera part de les emissions de mercuri tenen una font natural (H. Lamborg 2002). Degut a la seva alta volatilitat, la seva distribució atmosfèrica és global i homogènia. A l'atmosfera el trobem majoritàriament (90%) en forma elemental i la resta generant diverses formes gasoses reactives (reactive gaseous mercury, RGM), principalment com clorur de mercuri (HgCl_2) i hidròxid de mercuri ($\text{Hg}(\text{OH})_2$) (Steve E Lindberg 2002). En els ecosistemes aquàtics el mercuri inorgànic és metabolitzat per bacteris anaeròbics formant metilmercuri (CH_3Hg^+), que entra a la cadena alimentària a partir dels organismes bentònics que viuen al sediment. A part de la seva toxicitat, la principal característica a nivell mediambiental és la seva capacitat de bioacumulació. A cada esglaió de la cadena tròfica la concentració de metilmercuri s'incrementa, de manera que en alguns depredadors aquàtics, com la tonyina, pot arribar a nivells d'un milió de vegades del nivell de l'aigua (Carrier, Bouchard et al. 2001). En humans, el metilmercuri és ràpidament absorbit pel tracte gastrointestinal on se sol complexar amb la cisteïna i per proteïnes que contenen grups tiol (Kerper, Ballatori et al. 1992). El metilmercuri s'elimina lentament, amb una vida mitjana en sang humana de cinquanta dies (Carrier, Bouchard et al. 2001).

Diversos estudis associen l'exposició crònica de mercuri amb trastorns en la intel·ligència i la capacitat d'atenció dels nens (Rice, Schoeny et al. 2003). En adults incrementa el risc de malalties vasculars, incloent l'infart de miocardi (Rasanen and Mutanen 1995).

1.2.2.2 Plom

El plom és un metall escàs que representa únicament un 0.00002 % de l'escorça terrestre. La seva presència en quantitats majors a l'entorn està íntimament lligada al seu ús per l'ésser humà, fins i tot el plom emès al medi per fonts naturals es considera provinent de deposicions històriques d'origen antropogènic (Nriagu 1989). La contaminació per plom té el seu origen en la combustió de benzina amb plom (actualment prohibit a la UE), el procés de producció de pintures, d'acumuladors (piles o bateries), per terrisseries amb esmaltat, en la coloració de vidres, per indústries

químiques productores de tetraetil de plom, per algunes activitats mineres i agrícoles, etcètera.

Les dues principals vies d'accés dels compostos de plom a l'organisme són la respiratòria i el tracte gastrointestinal per la ingesta d'aliments contaminats (Ikeda, Zhang et al. 2000). Gairebé el 10 % del plom ingerit és excretat per l'orina i, en menor quantitat, per la suor, el pèl i les ungles. El 90 % del plom que es troba en el cos humà es diposita a l'esquelet ossi (Ikeda, Zhang et al. 2000). Els signes més comuns d'intoxicació aguda per plom (saturnisme) són gastrointestinals i els seus símptomes comprenen anorèxia, nàusea, vòmit, diarrea i sensació de malestar, seguit de còlics. A llarg termini el plom pot afectar la síntesi de l'hemoglobina i el temps de vida mitjana dels glòbuls vermells, així com al sistema nerviós central i perifèric. També pot afectar els ronyons, provocant inflamació de les cèl·lules de l'epiteli del tub proximal i alteracions funcionals que provoquen aminoacidúria, glucosúria i hiperfosfatúria (síndrome de Fanconi). L'Organització Mundial de la Salut recomana que el nivell de plom en sang per als nens i dones embarassades no passi dels 30 mg/100 ml de sang i prendre mesures dràstiques quan el nivell de plom en la sang dels adults arriba als 100 mg/100 ml de sang (WHO 2007)

1.2.2.3 Cadmi

La contaminació de l'aigua per cadmi és provocada per diversos processos industrials com són l'acabat de metalls, l'electrònica, la manufactura de pigments (pintures i agents colorants), de bateries (cadmi-níquel), d'estabilitzadors plàstics, de plaguicides (fungicides), l'electrodeposició, en la producció de ferro, zinc o d'aliatges de ferro, i en el funcionament de reactors nuclears (Nriagu 1989). Els alquil- i aril- cadmis s'usen com catalitzadors i les sals dels àcids orgànics (laurat, estearat, palmitat, fenolat, naftenat i benzoat de cadmi) com estabilitzadors tèrmics i de llum a plàstics com el clorur de polivinil (Nriagu 1989). L'ús d'estabilitzadors de bari-cadmi en plàstics contaminen els aliments emmagatzemats en ells. Per aquesta raó, la ingesta és la principal via d'exposició (>90%) en no fumadors, tot i que en zones altament contaminades la volatilització del cadmi dipositat en els sediments pot comportar una via molt important tant pel sistema respiratori com pel digestiu (WHO 2007).

L'exposició crònica a nivells elevats de cadmi pot provocar danys a l'aparell digestiu, als ronyons i als ossos, produint descalcificació i lesions en la medulla òssia, i inhibir alguns processos enzimàtics. La inhalació dels seus vapors produeix severes lesions als pulmons. A més s'ha observat que el cadmi té relació amb l'hipertensió arterial, la qual origina malalties cardíques.

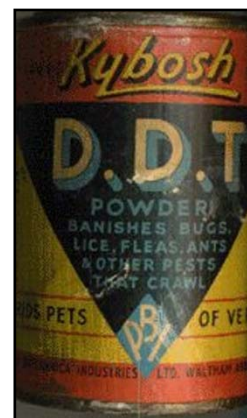
Com a mesura de seguretat, es recomana que els treballadors no siguin exposats a qualsevol compost de cadmi en aire més de 8 hores a concentracions majors de 40 mg/m³ (WHO 2007).

1.2.3. Compostos organoclorats

Un compost organoclorat (OC) és un compost químic orgànic al que alguns dels hidrògens de la cadena hidrocarbonada han estat substituïts per àtoms de clor. La seva presència al medi és totalment derivada de l'activitat humana, ja que no hi ha fonts naturals. El seu gran nombre d'aplicacions industrials i la seva enorme varietat estructural comporten una gran varietat d'aplicacions i, paral·lelament, un ampli ventall de possibles efectes als organismes exposats (Castells 2005). La cloració té tres efectes: augmenta l'estabilitat del compost, que es torna persistent, augmenta la seva hidrofobicitat, que el converteix en bioacumulable, i augmenta en molts casos la seva capacitat per interaccionar amb dianes específiques dins la cèl·lula (com els receptors) i així s'incrementa la seva activitat biològica com a xenobiòtic.

1.2.3.1. DDT i Derivats

El 1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-età, abans anomenat diclorodifeniltricloroetà, i més conegut com DDT, és un insecticida organoclorat que obre els canals de sodi provocant un col·lapse neuronal letal. Es va sintetitzar per primera vegada el 1874, però no va ser durant la Segona Guerra Mundial quan va començar a utilitzar-se de forma massiva per controlar les poblacions d'insectes que actuen com vectors de malalties com la malària. Més tard va arribar el seu ús agrícola i forestal. A la



dècada de 1970, diversos estudis posaren al descobert els seus perills potencials per la salut de persones i animals derivat de la seva gran capacitat de bioacumulació en teixits grassos degut a la seva alta liposolubilitat.

El DDT pot descompondre's en DDE (2,2-bis(p-clorofenil)-1,1-dicloretilè), compost altament estable i resistent al metabolisme dels organismes (Rogan and Chen 2005). En humans, una part del DDT ingerit es metabolitza a DDA (2,2-bis(4-Clorofenil)-Acètic) de fàcil excreció i la resta del DDT no metabolitzat i el DDE s'acumulen en el teixit adipós. La vida mitjana del DDE és de 7-11 anys una vegada es troba a l'interior dels organismes, per tant, tots aquells individus que es troben en poblacions exposades de forma continuada tendeixen a augmentar la seva concentració interna al llarg de la seva vida (Rogan and Chen 2005).

Els seus potencials efectes adversos per a l'espècie humana són múltiples, entre ells, anomalies o deformacions en el sistema reproductor (Beard, Marshall et al. 2000; Beard, Sladden et al. 2003; Beard 2006), pèrdua de mineralització i densitat en el teixit ossi (Derfoul, Lin et al. 2003), desenvolupament de càncers relacionats amb alteracions hormonals com el càncer de mama (Falck, Ricci et al. 1992), efectes en el sistema neuronal central a llarg termini (Eriksson and Talts 2000) o efectes sobre el sistema immunitari (Daniel, Huber et al. 2002). Actualment està catalogat per la OMS (Organització Mundial de la Salut) com un ingredient actiu de segona classe (moderadament perillós) i actualment el protocol d'Estocolm sobre els Contaminants Orgànics Persistents (COPs) limita el seu ús únicament pel control de la malària (www.pops.int).

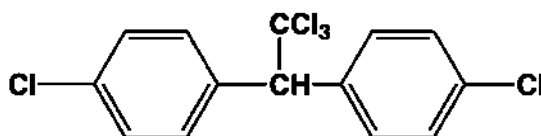
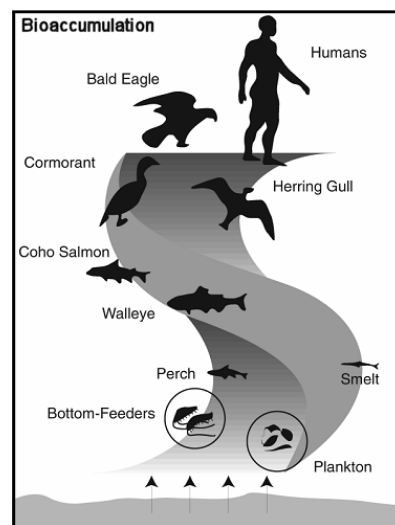


Figura 2. Estructura molecular del DDT

1.2.3.2. Bifenils Policlorats (PCB)

Els bifenils policlorats o PCB formen una sèrie de 209 compostos organoclorats sintetitzats mitjançant la cloració d'una o més de les deu posicions disponibles del bifenil. Els compostos als quals les posicions 2, 2', 6 i 6' no contenen cap àtom de clor els anomenem bifenils coplanaris. La seva fórmula empírica és $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, on "n" pot variar entre 1 i 10, essent majoritaris els congèneres de 2 a 7 clors. El període de vida mitjana d'aquests compostos al medi ambient pot variar des de 10 dies a un any i mig; generalment són



termostables i no fotosensibles. Degut a la seva termostabilitat i la seva elevada constant dielèctrica, els PCBs es varen fer servir de forma massiva a la dècada dels 70 com aïllants per equips elèctrics com (transformadors, interruptors, condensadors, etc). Aquesta mateixa estabilitat i hidrofobicitat són, a la vegada, determinants per la seva toxicitat, ja que faciliten la seva bioacumulació pels éssers vius.

Aproximadament el 25% dels PCB's assimilats per l'home ho són mitjançant la inhalació i el 75% restant per la ingesta de productes alimentaris, sent els procedents del medi aquàtic els més contaminats. Els seus efectes sobre la salut són molt amplis. A exposicions agudes produeixen lesions dèrmiques (cloracne), oculars i complicacions en l'aparell respiratori. A llarg termini pot provocar teratogènesi, immunotoxicitat, hepatotoxicitat i disrupció del sistema reproductiu i tiroïdal (Aoki 2001). Tots aquests efectes són deguts a la capacitat dels PCB coplanaris d'interactuar amb el receptor d'hydrocarbur d'aril. En el cas del no coplanaris, alguns d'ells tenen la capacitat d'interactuar o substituir molècules endògenes alterant l'homeòstasi, com el cas de la mimetització del 17β -estradiol.

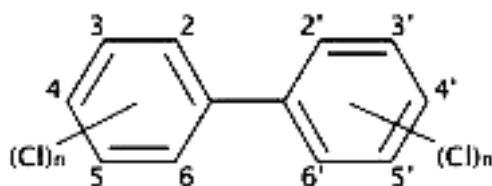


Figura 3. Estructura molecular dels PCB's

1.2.3.3. Hexaclorocicloxans (HCH)

Inicialment aquests compostos es van dissenyar per usos militars i durant la Primera i la Segona Guerra Mundial es va utilitzar àmpliament en la síntesi de bombes de fum. No va ser fins la restricció de l'ús del DDT als anys 70 que no es va començar a utilitzar com insecticida fins la prohibició de la seva síntesi l'any 1976.

Dels vuit isòmers possibles, l'únic amb activitat insecticida és el γ -HCH, tot i que només representa un 10-15% del total produït durant la síntesi industrial de l'HCH, on també se sintetitzen els isòmers α , β , δ i ϵ (Walker 1999). L'isòmer γ -HCH es comercialitza amb el nom de Lindà, i tant ell com la mescla tècnica d'isòmers s'usen (o s'usaven, ja que la legislació és cada cop més restrictiva), a més de com a pesticida contra insectes en cultius, en determinats medicaments i cosmètics dissenyats pel tractament de polls i sarna entre altres.

Al dispersar-se els HCH pel sòl una part es volatilitza i el que queda dipositat pot introduir-se a la cadena tròfica al ser absorbit per les plantes o els microbis presents al medi (Singh G 1991). Al sòl, l'isòmer predominant és el β -HCH i a l'aigua oceànica i l'aire ho és el α -HCH (Willett 1998).

A l'igual que el DDT, els HCH presenten una toxicitat aguda per exposició elevada, mentre que, a petites dosis, presenten una toxicitat crònica que pot provocar disfuncions en el sistema immunològic i en el sistema nerviós central; de fet, s'ha observat un efecte cancerigen en ratolins (Walker 1999). S'han observat també processos de pèrdua de memòria i un augment dels casos de migranya en treballadors que manipulen productes derivats del HCH (Nigam, Karnik et al. 1986).

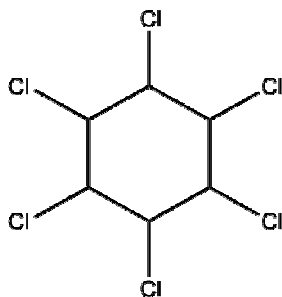


Figura 4. Estructura molecular del Hexaclorocicloxà

1.2.3.4.Hexaclorobencè (HCB)

La síntesi de l'HCB és la base per la formació d'altres productes químics com el pentaclorofenol (PCP) i pot sorgir com subproducte de la cloració industrial d'hidrocarburs. Se sol trobar al medi ambient procedent de la combustió de materials residuals, o bé com a conseqüència de la seva extensa utilització com a fungicida durant els anys seixanta. Donada la seva alta solubilitat en lípids, l'HCB s'acumula en el teixit adipós dels organismes i la seva fàcil absorció en el tub digestiu facilita enormement la seva presència a tots els nivells de la cadena tròfica. Tot i que la seva acumulació es realitza al teixit adipós, es pot mobilitzar i estar present a tots els òrgans del cos.

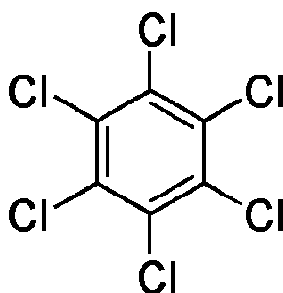


Figura 5. Estructura molecular del Hexaclorobencè

En humans està totalment comprovada la seva toxicitat crònica, produint danys cutanis i lesions hepàtiques. També s'han reportat efectes neurodegeneratius i carcinògens en dosis experimentals en rates.

1.2.4.Hidrocarburs Aromàtics Policíclics (PAHs)

Els hidrocarburs aromàtics són polímers cíclics conjugats derivats del benzè que compleixen la Regla de Hückel, és a dir, tenen un total de $4n+2$ electrons π a l'anell. Els més coneguts són el naftalè o l'antracè. Tots ells són poc solubles en aigua i solubles en dissolvents orgànics. El seu potencial risc ambiental i humà està molt relacionat amb la seva estructura, que a la vegada, condiciona la seva persistència al medi (Fetzer 2000). Els PAHs amb diversos (1-6) anells aromàtics a la seva estructura presenten majors graus de lipòfilicitat, toxicitat i persistència, encara que a partir d'una certa mida, la seva biodisponibilitat (i per tant toxicitat) tendeix a disminuir(ATSDR 2009).

Els PAHs es troben com a components naturals d'algunes matèries orgàniques com la torba, el lignit, el carbó i el petroli. També es troben en emissions d'incendis forestals i altres combustions (Jouko Tuomisto 2011). Els PAHs, especialment els de pes

molecular alt, es dispersen en el medi ambient per via atmosfèrica, sovint absorbits per partícules suspeses en l'aire. La contaminació d'aigües i sols es pot produir de forma secundària, per deposició d'aquestes partícules sobre la hidrosfera i la geoesfera o per l'abocament directe de residus que en continguin (Jouko Tuomisto 2011).

La principal via d'exposició en éssers humans és l'alimentària, tot i que, també poden ser absorbits per la pell o els pulmons. Altres possibles vies serien el contacte amb productes que en continguin o la inhalació d'aire pol·lucionat (trànsit, fum de llars de foc, cuines, fum de tabac, etc.) La via respiratòria, però, és més freqüent com a causa d'exposició laboral, majoritàriament en treballadors de refineries de petroli, pavimentació de carreteres, foneries d'alumini, mines de ferro i coure o fàbriques d'aliments fumats (Milbrath, Wenger et al. 2009; Jouko Tuomisto 2011). Els aliments crus presenten normalment nivells relativament baixos d'PAH, que es veuen notablement incrementats quan l'aliment és cuinat, sobretot quan és torrat, se sotmet a planxa, barbacoa, o bé en aliments fumats. En aquests casos els valors detectats poden arribar fins als 100 µg/kg.

En quant a la seva toxicitat, poden tenir activitat mutagènica. Alguns d'ells poden unir-se al receptor d'Hidrocarbur d'Aril (AhR) i, per tant, desencadenar efectes semblants a la dioxina ("dioxin-like") (Jouko Tuomisto 2011). La capacitat d'induir l'activació del receptor AhR s'ha mesurat en comparació amb el compost 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) establint els factors d'equivalència tòxica (TEF's) avalats per l'Organització Mundial de la Salut (Van den Berg, Birnbaum et al. 2006). Tots els compostos inclosos en aquesta llista presenten una estructura molecular que permet relacionar-los amb els PCDD's o els PCDF's, interactuen amb el AhR, provoquen respostes tòxiques o bioquímiques derivades d'aquesta unió i són persistents en la cadena alimentària (Van den Berg, Birnbaum et al. 1998). Els valors TEF es presenten en una escala on 1 representa l'equivalència tòxica amb el TCDD.

Taula 1. Valors TEF d'alguns dibenzofurans, dioxines i PCB's (Van den Berg, Birbaum et al. 2006)

Congènere	Toxicity equivalency factor (TEF)
<u>Dibenzo-p-dioxins</u>	
2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-PentaCDD	0.1
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	0.0003
<u>Dibenzo-furans</u>	
2,3,7,8-TCDF	0.1
2,3,4,7,8-PentaCDF	0.3
1,2,3,7,8-PentaCDF	0.05
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	0.1
OCDF	0.0003
<u>Polychlorinated biphenyls</u>	
3,3',4,4',5-PentaCB (PCB 126)	0.1
3,3',4,4',5,5'-HexaCB (PCB 169)	0.03
3,3',4,4'-TetraCB (PCB 77)	0.0001
2,3,3',4,4',5,5'-HeptaCB (PCB 189)	0.0003

Els efectes tòxics sobre humans provocats per una exposició prolongada dels compostos amb caràcter “dioxin-like” inclouen problemes reproductors, de desenvolupament, immunosupressió, problemes hormonals derivats de la seva interacció amb el sistema endocrí i poden provocar l'aparició de diversos tipus de càncer (W.H.O. 2010). La capacitat cancerígena de diversos compostos tipus dioxina està totalment demostrada i la IARC (Agency for Research on Càncer) ha catalogat el TCDD com a “Carcinogen conegut per als humans” (W.H.O. 2010). De la mateixa forma la The United States Environmental Protection Agency (EPA) ha classificat alguns PAH en el grup B2 (carcinògens humans probables, amb evidència suficient d'estudis realitzats en animals i evidència inadequada o inexistent a partir d'estudis epidemiològics); altres en el grup D (no classificats a causa del caràcter inadequat de les dades sobre humans i animals) i altres en el grup C (carcinògens humans possibles, amb evidència limitada d'estudis en animals i sense informació sobre els éssers humans)(MassDep 2005) .

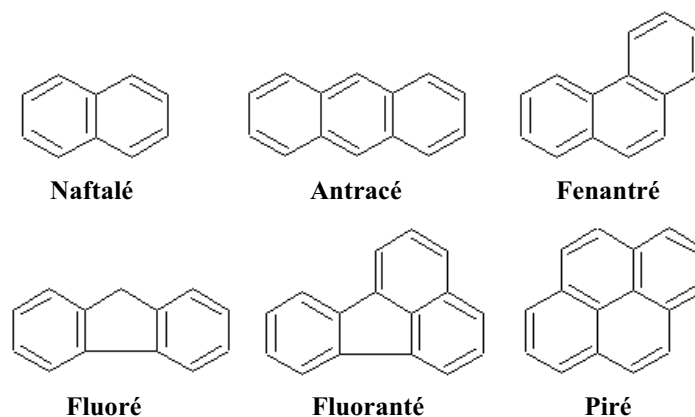


Figura 6. Estructura molecular de diversos Hidrocarburs Aromàtics Policíclics

1.3 Metabolisme i acció dels xenobiòtics

El metabolisme dels xenobiòtics modifica les propietats fisicoquímiques d'aquestes substàncies per tal de permetre o accelerar la seva excreció per les possibles rutes de secreció com l'orina, la femta, l'alè i la suor. Aquestes rutes metabòliques són una forma de biotransformació present en tots els grups principals d'organismes i es considera que tenen un origen ancestral. Aquestes reaccions sovint funcionen positivament detoxificant compostos verinosos; tanmateix, en alguns casos, els intermedis del metabolisme xenobiòtic poden causar efectes tòxics per si mateixos.

Generalment aquestes reaccions es realitzen al fetge, tot i que tots els teixits tenen certa activitat metabòlica, especialment el ronyó. Podem dividir el conjunt de processos en tres fases, anomenades fase I, II i III. (Danielson 2001)

A la fase I, generalment el conjunt de reaccions introdueixen o exposen un grup funcional de la molècula original. Les principals reaccions en aquesta fase són d'oxidació-reducció i d'hidròlisi. Aquests processos es duen a terme mitjançant la família d'enzims citocrom P450, de la qual s'han comptabilitzat fins a dia d'avui més de 200 isoformes. Mitjançant aquest enzim, NADPH i oxigen molecular, les molècules augmenten la seva polaritat i es facilita la seva modificació per fase II.

A la fase II, també coneguda com fase de conjugació, les molècules tractades a la fase I són modificades mitjançant la formació d'un enllaç covalent entre un dels seus grups funcionals i d'una molècula com l'àcid glucurònic, sulfats, glutatió, aminoàcids o acetat, mitjançant enzims amb activitat transferasa. Això permet generar uns compostos més estables i de fàcil excreció per l'orina, degut a la seva alta solubilitat amb l'aigua.

Finalment, la fase III és aquella en la qual diverses proteïnes transportadores de membrana bombegen les molècules prèviament bioatransformades a l'exterior cel·lular.

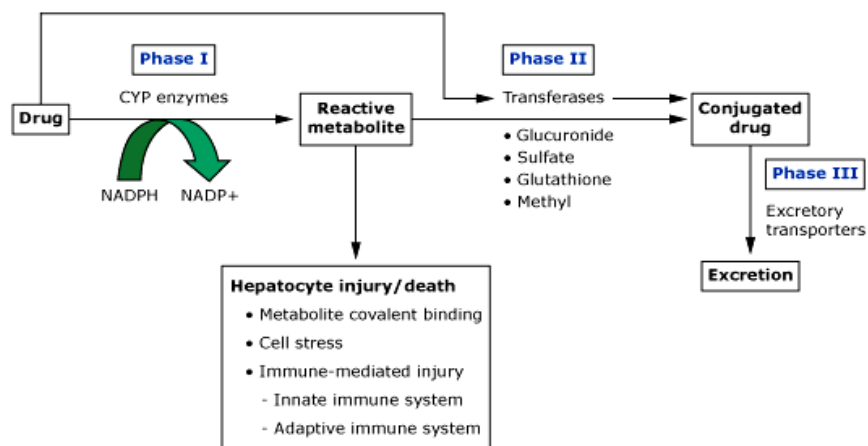


Figura 7. Conjunt de processos dividits en les tres fases característiques del metabolisme de xenobiòtics

1.3.1 Bioacumulació i biomagnificació

La bioacumulació és el procés d'acumulació de substàncies químiques en organismes vius de forma que aquests arriben a concentracions més elevades que les concentracions en el medi ambient o en els aliments com a conseqüència de la impossibilitat o baixa capacitat de degradació del contaminant o els seus metabòlits. El procés de Bioacumulació pot comportar l'aparició de la Biomagnificació, que és l'increment de la concentració química d'una substància, que ocorre dins la cadena alimentària. Els principals grups de contaminants amb aquesta capacitat tenen caràcter lipofílic, ja que són molt fàcilment bioacumulables al teixit adipós. Aquest tipus de substàncies es coneixen com POPs (Persistent Orgànic Pollutants), entre els quals trobem els compostos organoclorats, lipofílics i amb enllaços clor-carboni difícils de trencar i per tant de difícil metabolització i eliminació per als organismes que s'hi troben exposats.

1.3.2. Els xenobiòtics i les hormones

Als sistemes dinàmics complexos, petites variacions en les condicions inicials poden produir grans variacions en el seu comportament final ("Efecte Papallona"). En aquest sentit, els xenobiòtics capaços de desestabilitzar els sistemes reguladors dels organismes poden tenir efectes devastadors a concentracions molt baixes. Un clar exemple són aquells compostos amb capacitat disruptora del sistema hormonal endocrí.

La funció de les hormones es pot entendre des d'un context adaptatiu. L'aparició dels metazous, organismes multicel·lulars on els diferents teixits s'especialitzen en diferents funcions, va comportar l'aparició de mecanismes de comunicació entre els teixits per poder coordinar les seves activitats i així mantenir la constància del medi intern o homeòstasi (Eckert 2004). Segons la definició de Walter Cànnon (1871-1945) les hormones són uns dels agents més importants en establir aquesta comunicació entre els diferents teixits. La primera hormona en ser descoberta va ser la secretina per E.H Starling el 1908 i va ser aquest autor que va proposar el terme derivat del grec "*Jo estimo*".

El sistema hormonal endocrí està constituït per diverses glàndules que secreten hormones al torrent sanguini que interactuaran amb les cèl·lules diana mitjançant receptors específics. Les seves estructures són diverses, el que ens permet agrupar-les en quatre classes segons la seva configuració química:

- **Les Amines**
Molècules petites derivades dels aminoàcids.
Inclouen les catecolamines, adrenalines o les hormones tiroïdals.
- **Prostaglandines**
Són lípids instaurats complexos sintetitzats en les membranes a partir d'àcids grassos lineals amb cadenes de 20 carbonis.
- **Hormones esteroides**
Derivats d'hidrocarburs cíclics derivats del colesterol.
La testosterona i l'estrogen són clars exemples d'aquest grup.
- **Hormones peptídiques o proteiques.**
Més grans i complexes que els altres tres grups.
La insulina és un exemple d'aquest grup.

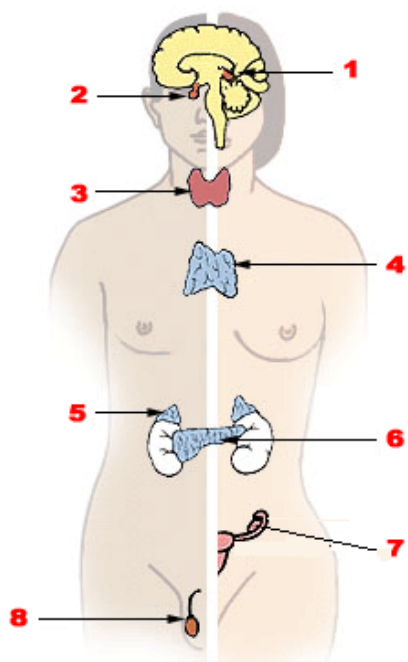


Figura 9. Conjunt de glàndules endocrines: 1. Glàndula Pineal, 2. Glàndula Pituïtària, 3. Glàndula Tiroïdal, 4. Tim, 5. Glàndula Adrenal, 6. Pàncrees, 7. Testicles i 8. Ovaris.

En comparació amb altres molècules comunicatives dels organismes, com els neurotransmissors, les hormones endocrines transmeten la informació més lentament, a distàncies més llargues i permetent una resposta mantinguda durant minuts, hores o fins i tot dies.

El sistema endocrí permet funcions molt diverses i essencials pels vertebrats, com el manteniment de l'osmolaritat en sang (hormona antidiürètica), el contingut en sucres de la sang (insulina, glucagó), la regulació de la taxa metabòlica (hormona del creixement i tiroxina), o diverses funcions reproductives (testosterona, estrogen, progestans). La Figura 9 mostra alguns dels òrgans que formen part del sistema endocrí humà.

Els nivells d'hormona en sang es poden regular de dues formes. La primera es realitza mitjançant el procés de retroalimentació, és a dir, la pròpia hormona genera una resposta augmentant o disminuint la seva síntesi o secreció. Aquesta resposta directa pot ser deguda a la sensibilitat del sistema per la concentració d'hormona lliure, o bé per la resposta directa del teixit diana que actua directament sobre l'origen de l'hormona, com és el cas de la concentració de glucosa i la quantitat d'insulina lliure en sang.

La segona forma de regulació dels nivells hormonals és mitjançant l'anteroalimentació. Aquesta es regula mitjançant les neurohormones alliberades per neurones especialitzades i amb una actuació directa sobre els teixits endocrins. La principal font de neurohormones és l'eix hipotalàmic-hipofisiari. La hipòfisi i l'hipotàlem estan connectats per un sistema capil·lar (sistema portal) provinent de l'artèria carotídia, que primer irriga i permet el transport de diferents neurohormones amb la funció reguladora cap a la hipòfisi. El procés s'inicia quan el sistema nerviós central rep un estímul. L'hipotàlem rep aquest estímul actuant sobre la hipòfisi que segrega les respectives neurohormones corresponents al propi estímul. Aquestes actuen sobre l'adenohipòfisi o

la neurohipòfisi, que finalment, alliberen les respectives hormones al torrent sanguini i que actuen específicament sobre els seus diferents teixits diana. En aquest moment l'òrgan diana segrega a la vegada la seva pròpia hormona que actua sobre l'hipotàlem o directament sobre la hipòfisi, autoregulant l'estímul inicial.

1.3.2.1 Els disruptors endocrins

Un disruptor endocrí és tota substància amb capacitat d'alterar l'equilibri hormonal d'un organisme. El catàleg de productes amb aquesta capacitat augmenten cada dia i inclou tant substàncies sintètiques creades per l'home com d'altres que es troben de manera natural a l'ambient. Entre aquestes substàncies podem trobar hormones alliberades al medi, fitoestrògens, pesticides o, com s'ha comentat en anteriors apartats, productes derivats de la fabricació de plàstics, com el Bisfenol A.

Tot i que la lectura de *The Silent Spring* de Richard Carson s'ha d'entendre dins d'un context històric, no va ser fins l'aparició d'aquest llibre que no es va prendre consciència dels danys a llarg termini que pot causar als organismes l'exposició a certes substàncies. El 1991 es va proposar el nom de disruptors endocrins per part de Theo Colborn (Theo Colborn 1991) i el terme va ser mencionat per primer cop en una publicació científica l'any 1993.

Els mecanismes d'acció dels disruptors endocrins són tan variats com els mateixos sistemes endocrins, tot i que podem dividir-los en quatre grups principals, segons actuin:

- Imitant l'acció de les hormones.
- Antagonitzant l'acció de les hormones.
- Alternant el patró de síntesis i metabolisme hormonal.
- Modulant el nivell dels receptors disponibles.

A aquests diversos mecanismes d'acció se li ha de sumar la gran diversitat de patrons dosis resposta possibles. En la majoria dels casos, la resposta de l'organisme a la presència del contaminant no és lineal amb la dosi, i les concentracions efectives d'un contaminant varien en diversos ordres de magnitud depenent la seva naturalesa química,

els períodes de latència i bioacumulació, etc. El patró dosi resposta més habitual en els disruptors endocrins descriu una corba sigmoide. Els disruptors endocrins presenten una sèrie de característiques comunes a l'hora d'estudiar-los a ells o als seus efectes que condicionen qualsevol aproximació de causalitat buscada entre exposició i malaltia:

- Els efectes de l'exposició varien depenent de l'estat de desenvolupament de l'individu exposat (Embrió, juvenil o adult).
- Els efectes poden no aparèixer en el moment de l'exposició.
- No existeix un llindar de concentració precisa per al desenvolupament de l'efecte toxicològic.
- Poden presentar efectes sinèrgics, additius i antagònics.

1.3.3 Els receptors nuclears com a molècula diana dels xenobiòtics.

Les accions amb les quals un xenobiòtic pot alterar l'equilibri hormonal d'un organisme són diverses. En aquest treball prenen especial importància els mecanismes que inclouen la interacció d'aquests elements exògens amb determinats receptors nuclears com el Receptor d'Hidrocarbur d'Aril (*Secció 1.4.1.7.1*), el Receptor d'Estrògens (*Secció 1.4.1.6*) o el Receptor de l'Hormona Tiroïdal (*Secció 1.3.4.2*). Els receptors nuclears són proteïnes específiques presents en els metazous, localitzades a l'interior cel·lular i amb la capacitat de desencadenar respostes cel·lulars específiques mitjançant la unió selectiva a molècules de petit pes molecular, els lligands. La seva principal funció és actuar com a Factors de Transcripció Facultatius, regulant l'expressió de determinats gens mitjançant la seva capacitat d'unió al DNA. Els lligands són sempre específics per a cada receptor, i poden ser de naturaleses molt variades. Generalment, les constants d'unió receptor-lligand estan per sota del nivell nM convertint-lo en el sistema regulador més sensible en els éssers vius. Degut a la seva capacitat d'interaccionar amb el DNA i a la baixa concentració de lligand necessari per tal d'activar-los, el mimetisme de determinades substàncies (Xenobiòtics) com a lligands té grans conseqüències fisiològiques. Els seus lligands són normalment compostos lipofílics o lleugerament polars, i han de tenir la capacitat de travessar la membrana plasmàtica, ja que els receptors nuclears es troben sempre en el nucli o en el citoplasma cel·lular.

La majoria dels receptors nuclears presenten una estructura primària formada per una sèrie de regions o dominis comuns que consta de: (Ruff et al., 2000) (*Figura 10*)

- A/B: Situat a la zona N-terminal del receptor presenta una alta variabilitat i conté un dels dos dominis amb funció d'activació transcripcional (AF) que presenten els receptors nuclears, l'AF-1. Aquest domini d'activació permet la interacció proteïna-proteïna i permet, en determinats receptors, l'activació de la transcripció sense la interacció amb els seus lligands específics mitjançant la unió a determinats cofactors.
- C: Domini altament conservat on trobem el domini d'unió al DNA (DBD, DNA Binding Domain) responsable del reconeixement de les seqüències específiques de DNA o elements de resposta a hormones. El reconeixement es realitza mitjançant dos dits de zinc, estructures en forma de llaç que presenten un anell format per un àtom de zinc i quatre residus de cisteïna (Green et al., 1988).
- D o hinge: En la regió central, és el menys conservat i les seves funcions estan relacionades amb la localització intracel·lular, ja que conté el senyal de localització nuclear que determina si un receptor lliure és citoplasmàtic o nuclear (Ikeda et al., 2001). També interacciona amb altres factors o transportadors i facilita l'estabilització de la unió al DNA entre d'altres funcions (Menuet, Pellegrini et al. 2002).
- E: Situat a la zona N-Terminal conté el domini d'unió al lligand (LBD, Ligand Binding Domain) altament conservat i responsable de la unió als lligands específics. L'LBD està format per onze o tretze hèlixs α i diverses fulles β que formen una cavitat d'unió lipofílica (Italians and Segler, 1998). A prop del domini N-terminal es troba un residu de lisina molt conservat que és essencial per a l'activació transcripcional (Whitfield et al., 1995; Nolte et al., 1998). A la vegada presenta el lloc d'unió d'una proteïna de xoc tèrmic, l'Hsp90 i el segon AF implicat en la transactivació, l'AF-2. AF-2 és estrictament dependent de lligand i la seva unió és necessària per a provocar el canvi conformacional que el deixarà exposat a la maquinària transcripcional (Johnson and Craig, 2000).

- F: és el domini C-terminal

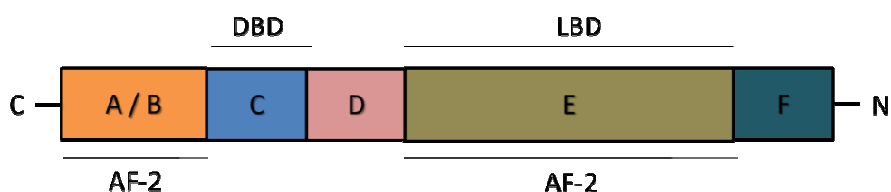


Figura 10. Regions d'un receptor hormonal nuclear.

1.3.4. Els Xenobiòtics i la disrupció tiroïdal

1.3.4.1. L'eix tiroïdal

En aquest treball s'ha aprofundit en els efectes que alguns disruptors endocrins tenen sobre l'eix tiroïdal. Les hormones tiroïdals (TH) són produïdes per la glàndula tiroïdal i són responsables de regular el correcte desenvolupament embrionari, el funcionament del sistema cardiovascular, musculoesquelètic i hematopoètic, així com una sèrie de respostes corporals com el control de la calor, consum d'oxigen i la regulació d'altres sistemes hormonals.

Els components essencials de l'eix tiroïdal han estat evolutivament conservats en els vertebrats i presenten una gran similitud entre les espècies (Power, Llewellyn et al.2001). Les hormones tiroïdals són secretades per una única capa de cèl·lules epitelials del fol·licle tiroïdal. Els iodurs adquirits per la ingesta es converteixen en iode orgànic mitjançant la peroxidasa tiroïdal, i són incorporats a una molècula de l'aminoàcid tirosina. Aquestes tirosines poden rebre un o dos àtoms de iode, formant-se monoiodetirosina o bé deiodetirosina respectivament i que posteriorment es combinen per donar lloc a la tiroxina T4 o la triiodetironina T3.

- Diiiodetirosina + Diiiodetirosina --> Tetraiodetirosina [tiroxina, T4].
- Diiiodetirosina + Monoiodetirosina --> Triiodetironina [T3].

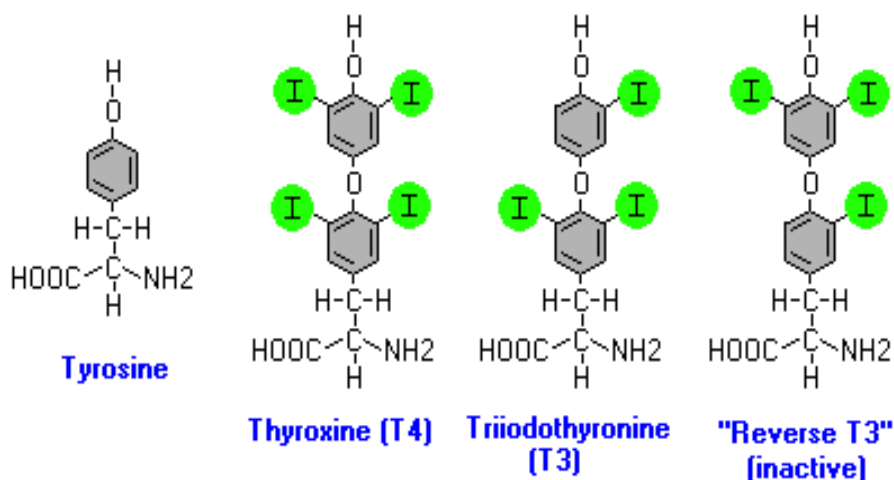


Figura 11. Estructures moleculars de la Tiroxina, Tiroxina (T4), Triiodetironina (T3) i T3 reversa (rT3)

La principal hormona secretada és la Tiroxina (T4), que té una baixa activitat biològica. La seva principal funció és servir de precursora de l'hormona triiodetironina (T3), la forma biològicament activa. Aquesta transformació se sol produir en els teixits perifèrics mitjançant l'eliminació enzimàtica d'un dels iodis presents a l'anell extern de la T4 per les deiodinases (ORD) (Power, Llewellyn et al. 2001). La inactivació de l'hormona T3 es produeix principalment al fetge, ronyó, cervell i múscul, majoritàriament per ionització de l'anell intern (IRD) (Kruger, Sharma et al.), tot i que, també pot tenir lloc al fetge per desaminació o descarboxilació com a pas previ a la seva secreció a través de la bilis.

1.3.4.2 El receptor de l'hormona tiroïdal:

L'acció de les hormones tiroïdals es realitza mitjançant la unió a receptors nuclears específics (Receptor Tiroïdal, TR) amb la característica de mantenir-se en el nucli independentment de si estan units als seus coactivadors o corepressors (Klinge, Bodenner et al. 1997).

Els vertebrats tenen dos gens que codifiquen per dos receptors de l'Hormona Tiroïdal: El gen *thra* (TR α) i *thrb* (TR β). El gen *thra* genera dos productes gènics (TR α a i TR α b) mitjançant el processament de l'RNA (splicing) (Liu, Lo et al. 2000). L'expressió temporal i espacial d'aquests dos gens constitueix un important mecanisme de regulació, permetent un ventall d'accions diferents depenent del teixit on actuen i de l'estat de desenvolupament de l'organisme (Flamant and Samarut 2003).

Com tots els receptors nuclears (*Secció 1.3.3*), els TR presenten el domini DNA Binding Domain (DBD), responsable del reconeixement de les seqüències específiques de DNA per al TR (Element de Resposta a Hormona Tiroïdal, TRE). En la seva forma inactiva TR es troba formant un heterodímer amb el Receptor X Retinòic (RXR) unit als TRE mitjançant el domini DBD (Harvey and Williams 2002). Amb absència de l'hormona tiroïdal, l'heterodímer RXR-TR es troba unit als seus corepressors com el Nuclear Corepressor (N-Cor) o el Silencing Mediator For Retinoic and Thyroid Hormone Receptors (SMRT) (Linney, Perz-Edwards et al. ; Aranda and Pascual 2001). El paper de la TH és promoure un canvi conformacional del LBD dels TRs permetent la interacció amb els complexos proteics SRC o TRAP (Harvey and Williams 2002). El paper d'aquest conjunt de coactivadors no està del tot clar, tot i que es creu que la seva funció principal és activar determinades histones acetilases que alterarien l'estructura de la cromatina al voltant del domini TRE fent possible l'acció del complex transcripcional (Harvey and Williams 2002). Tant els complexos activadors SRC i TRAP com els repressors N-Cor i SMRT presenten interaccions amb un ampli nombre de receptors nuclears, per tant la regulació de l'acció dels TRs presenta una estreta relació amb altres rutes transcripcionals cel·lulars (Harvey and Williams 2002).

1.3.4.3. La regulació enzimàtica de l'eix tiroïdal mitjançant: Les Deiodinases

Les deiodinases representen una de les principals vies de regulació tiroïdal tant en mamífers com en peixos. En els dos s'han descrit tres isoformes I, II i III, encara que les seves funcions respectives semblen diferir entre els dos tàxons (Power, Llewellyn et al. 2001).

Les deiodinases són proteïnes encarregades de l'eliminació dels àtoms de iode de la T4 i la T3. Es tracta de proteïnes dimèriques integrades a la membrana cel·lular mitjançant un domini transmembrana, i amb un domini tioredoxina que s'encarrega d'eliminar el iode. Existeixen a vertebrats tres isoformes: el tipus I (D1) i el tipus 3 (D3) es troben a la membrana plasmàtica i el tipus 2 (D2) està situada en la membrana del reticle endoplasmàtic. Mitjançant la deiodinització de T4, la D2 produeix la forma activa T3 i mentre que la D3 genera la T3 reversa (rT3), que és inactiva (*Figura 12*)

A *Danio rerio* les deiodinases D3 i D2 estan codificades pels gens *dio3* i *dio2* respectivament. En ratolins s'ha comprovat que l'activitat de les deiodinases està regulada pels seus nivells d'expressió que, alhora, està regulada pels nivells de T3 i T4 en sang. Al augmentar la quantitat de T3 circulant augmenta l'expressió de *dio3* i disminueix la de *dio2* (Zavacki AM 2005). Hi ha altres mecanismes de regulació, com per exemple, aquells relacionats amb les concentracions relatives T4/T3 estudiats en humans: si la concentració de T4 és dues vegades major que la de T3, la T4 s'uneix a un transportador que l'introdueix a l'interior cel·lular on és metabolitzada per la D2 (Bianco and Kim 2006). Una altra via de regulació és la degradació de les diferents deiodinases mitjançant processos d'ubiquitinització i desubiquitinització, que afavoreixen o retarden la seva proteòlisi, respectivament, depenent de les necessitats cel·lulars.

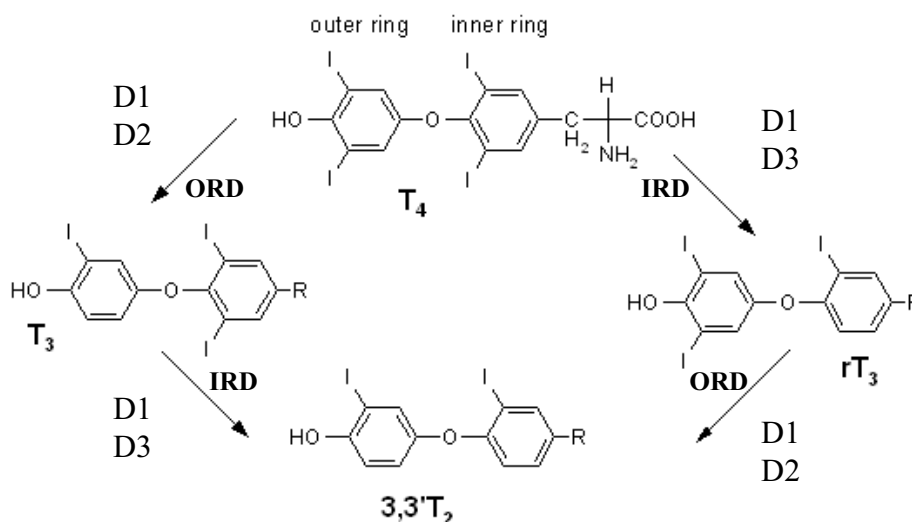


Figura 12. Reaccions bàsiques de les deiodinases.

1.3.4.4. Disruptors tiroïdals

Els contaminants disruptors tiroïdals (TDC) són xenobiòtics amb la capacitat d'alterar l'estructura o la funció de la glàndula tiroïdal, alterar la regulació dels enzims associats a les hormones tiroïdals, la seva homeòstasi o la seva concentració (Crofton 2008). Com es pot observar en la següent taula, existeixen multitud d'estructures químiques amb la capacitat d'interactuar amb el sistema tiroïdal actuant com a TDCs mitjançant un gran nombre de mecanismes (Patrick 2009).

Taula 2. Mecanismes i efectes dels diferents Disruptors Tiroïdals (Patrick 2009)

Disruptor Tiroïdal	Mecanisme	Efecte
Perclorats, Nitrats, Bromats i Ftalats.	Bloqueig de la recaptació de Iode a les cèl·lules tiroïdals.	Disminució de la síntesi de T3 i T4.
Metimazol, Isoflavones i Benzofenona.	Bloqueig de producció de TPO als fol·licles tiroïdals.	Disminució de la síntesi de T3 i T4.
PCSB's, Retardants de flama i Ftalats	Unió competitiva a la proteïna transportadora TTR	Possible efecte en la producció de T4 en estadis fètals
Dioxines, PBDE's	Alteració del transport transmembrana	Augment de la secreció biliar de T3 i T4
PCB's	Augment del Metabolisme hepàtic.	Augment del metabolisme Biliar de T3 i T4
PCB's, Triclosan i Dioxines.	Inhibició de la Sulfatació	Disminució de la síntesi de T3
PCB's	Inhibició de les deiodinases	Disminució de la síntesi de T3
PCB's, Bisfenol A, Hexaclorobenzè i Retardants de flama.	Alteració de la unió a TR	Alteració de la transcripció de les TH.
DDT's, PCB's	Inhibició del receptor de TSH.	Disminució de la producció de T3 i T4.

Actualment es coneixen poc els riscos ambientals dels TDCs, donat el gran nombre de dianes que té el sistema tiroïdal per aquests tòxics, i també perquè és difícil extrapolar informació dels mecanismes d'acció dels TDCs a humans a partir dels estudis en animals d'experimentació. A la vegada s'afegeix la capacitat d'addició, antagonisme o sinergisme que poden presentar aquests xenobiòtics si actuen acompanyats per altres disruptors endocrins tot i que individualment no actuen com a tals (Crofton 2008).

Els mecanismes mitjançant els quals es pot modificar l'homeòstasi de l'eix tiroïdal es poden agrupar en sis grups ben diferenciats:

1.3.4.4.1 Canvis en la síntesi o secreció de l'Hormona Tiroïdal.

Aquests canvis poden ser deguts a variacions en la funció de la Tirotropina (TSH) Aquesta és una hormona generada per la hipòfisi amb funció d'activar la producció de TH, principalment de T4. La seva funció es pot veure alterada per l'acció de xenobiòtics que inhibeixen la seva síntesi o modifiquen el seu transport al sèrum. També es poden produir variacions en la concentració de TH en sèrum per alteració en la síntesi als fol·licles tiroïdals (Zoeller 2007). Un clar exemple són compostos que impedeixen la captació de molècules de iode per part del fol·licle tiroïdal, com els perclorats, o bé

aquells amb efectes citotòxics que poden afectar la viabilitat de les cèl·lules del fol·licle, com l'Amiodarona (Cunha and van Ravenzwaay 2005).

1.3.4.4.2 Alteracions en les proteïnes de transport i de captació cel·lular

T3 i T4 circulen pel plasma sanguini unides a diverses proteïnes transportadores, com l'Albúmina o la Transtiretina (TTR) (Power, Llewellyn et al. 2001) Diversos estudis demostren que alguns PCBs, retardants de flama i ftalats poden desplaçar la T4 de la seva proteïna transportadora en el sèrum i alterar els nivells efectius de T4 en sang (Purkey, Palaninathan et al. 2004; Boas, Feldt-Rasmussen et al. 2006). Diversos contaminants com els DBP's i els BBP han demostrat inhibir la captació cel·lular de les TH en els glòbuls vermells a *Rana catesbeiana* (Shimada and Yamauchi 2004), tot i que aquest efecte disruptor no s'ha observat ni en mamífers ni en peixos.

1.3.4.4.3 Xenobiòtics que interaccionen amb els TRs o la seva expressió

Actualment s'estan estudiant un gran nombre de compostos que es creuen capaços d'interaccionar amb els TRs i que per tant, podrien actuar com a agonistes o antagonistes competitiu del lligand natural. Estudis realitzats en cultius cel·lulars humans han demostrat que alguns PCBs alteren l'expressió dels gens lligats a la TH actuant-hi com a antagonistes bloquejant l'acció del domini DBD. (Miyazaki, Iwasaki et al. 2004; Miyazaki, Iwasaki et al. 2008). Un altre mecanisme potencial de disrupció tiroïdal és l'alteració de l'expressió gènica dels mateixos gens dels TRs. Això s'ha vist, per exemple, al BPA que provoca una disminució en l'expressió de TR β a les cèl·lules dendrítiques de ratolí (Seiwa, Nakahara et al. 2004).

1.3.4.4.4 Alteració de la funció de les Deiodinases i del Metabolisme de l'Hormona Tiroïdal.

També són nombrosos els mecanismes pels quals els xenobiòtics poden alterar els nivells circulants de TH. Diversos hidrocarburs halogenats tenen la capacitat d'augmentar l'expressió de la UDPGT mitjançant l'activació de AhR (Dixit, Tirona et al. 2005) (Kretschmer and Baldwin 2005). També s'ha pogut comprovar mitjançant experiments in vitro en teixit de fetge humà que la deiodinasa tipus 5 disminueix la seva activitat sota els efectes dels organoclorats, el plom o el cadmi entre altres substàncies (Wade MG 2002)

1.4 Espècies sentinella:

Les espècies sentinella són aquelles que, tant de procedència salvatge o establada, s'usen directa o indirectament per mesurar els nivells de contaminació i/o els seus efectes mitjançant procediments analítics ben definits. Els animals sentinelles permeten, a diferència de les metodologies químiques, detectar efectes de cada contaminant sota diverses condicions controlades que ens permeten simular condicions naturals, realitzar mesclures de contaminants, exposicions cròniques, etc. S'ha de tenir en compte que de la mateixa manera que no tots les contaminants tenen la mateixa importància en medis diferents, no tots els animals són adients per la monitorització ambiental (Capo Martí 1999). Per tant, la selecció d'un animal sentinella adequat per un bioassaig determinat ha de complir una sèrie de condicions (American Public Health Association, 1976)

- L'organisme ha de ser sensible als factors ambientals o als contaminants en qüestió.
- Ha de ser de fàcil manteniment en el laboratori o bé, si l'estudi es realitza al camp, la seva distribució ha de ser àmplia i la seva disponibilitat suficient pels nostres fins.
- Ha d'estar ben adaptat a l'ambient que s'estudia
- Ha de ser compatible amb les tècniques del bioassaig.

1.4.1 *Danio rerio*

Danio rerio té moltes propietats que el fan un excel·lent animal d'estudi: té un cicle de vida curt, de 2 a 4 anys; es pot mantenir fàcilment en un estabulari amb altes taxes de densitat poblacional (Haffter and Nusslein-Volhard 1996); i disposem del seu genoma totalment seqüenciat. Cada parella reproductora és capaç de produir aproximadament 200 embrions externs i transparents a la setmana, la qual cosa facilita en gran mesura el seu estudi (Haffter and Nusslein-Volhard 1996)

Aquest ciprínid actinopterigi (peixos amb aletes radiades) originari del sud-est asiàtic rep el seu nom comú, peix zebra, degut a les bandes uniformes pigmentades de color blau fosc que té als dos costats. Les poblacions salvatges són originàries del Pakistan, Índia, Bangladesh, Nepal i Myanmar (Menon 1999), tot i que ha estat introduït accidentalment a altres països com el Japó, Estats Units, Austràlia o Colòmbia com a conseqüència del seu ús en aquarioria ([Buchanan] 1822). Actualment és considerat una espècie cosmopolita.



Danio rerio

En estat salvatge viu en canals, rierols i en zones d'aigües calmades, com els camps d'arròs (Talwar 1991), alimentant-se de cucs, crustacis i petits insectes (Spence 2007). Té la capacitat de reproduir-se tot l'any, però en estat salvatge la posta s'indueix de manera natural pels canvis de temperatura a l'aigua, produïts sobretot durant el monso (Spence 2007).

Morfològicament són peixos allargats, fusiformes, amb una única aleta dorsal i la boca dirigida cap a dalt amb un parell de barbes. El color de fons és daurat o platejat i sobre ell es presenten de 5 a 9 bandes longitudinals de color blau fosc que comencen just darrere de l'opercle i arriben fins a la cua. L'opercle és blavós i la zona ventral blanca té tonalitats rosades. Les femelles tenen un abdomen més gran i el color entre les bandes blaves més pàl·lid. En estat adult poden arribar a 5cm de longitud màxima.

El primer investigador que va utilitzar aquesta espècie com organisme model fou George Streisinger de la Universitat d'Oregó als Estats Units.

1.4.1.1 Desenvolupament embrionari de *Danio rerio*:

Les diferents fases del desenvolupament embrionari del peix zebra estan molt ben caracteritzades i segueixen un estricte patró temporal. Tot i això, factors com la temperatura (crucial) o el fons genètic poden fer variar la duració de cada fase; fins i tot

és possible trobar diferències subtils entre embrions provinents d'una mateixa posta. Internacionalment s'ha establert que les primeres hores de desenvolupament són definides amb les unitats hpf (Hours Post Fertilization) i posteriorment amb les unitats dpf (Days Post Fertilization) (Kimmel, Ballard et al. 1995).

Estadi unicel·lular: (0 - 0,7 hpf)

Una vegada els ous han estat fertilitzats s'inicia la fase zigòtica que dura fins als 40 minuts posteriors a la fertilització (Charles B. Kimmel 1995). Transcorreguts els primers deu minuts el còrion comença a augmentar de mida i s'inicien els primers moviments citoplasmàtics. El citoplasma sense vitel comença a fluir cap al pol animal formant el blastocist que romandrà en un extrem separat de la resta del zigot ocupat pel vitel (Charles B. Kimmel 1995).

Fase de clivellament: (0.7- 2.2 hpf)

Després de la primera divisió, les cèl·lules, o blastòmers, es divideixen cada 15 minuts aproximadament realitzant un total de 6 divisions (*Figura 13*). Les divisions citoplasmàtiques són parcials (meroblàstiques) tallant els blastòmers que romandran interconnectats per ponts citoplasmàtics i que s'acumularan al pol animal formant el blastodisc. Aquestes sis divisions consecutives sempre apareixen amb una orientació regular.

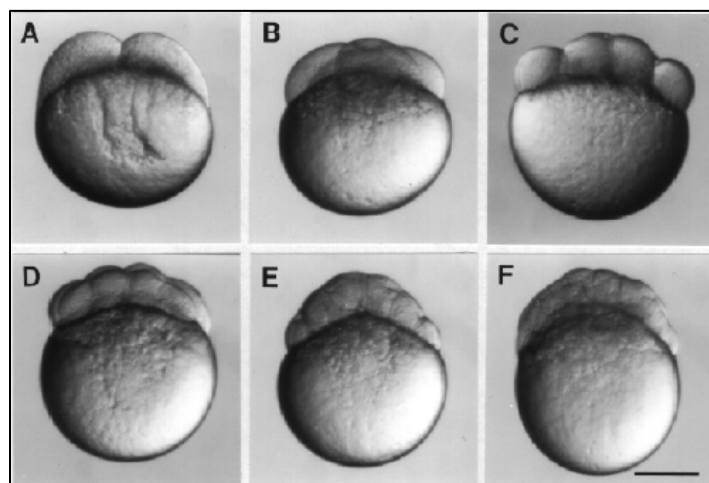


Figura 13. Fase de clivellament A: 2-cell stage (0.75 h). B: 4-cell stage (1 h). C: 8-cell stage (1.25 h). D: 16-cell stage (1.5 h). E: 32-cell stage (1.75 h). F: 64-cell stage (2 h). Scale bar: 250 μ m (Charles B. Kimmel 1995)

Formació de la Blàstula: (2,25 - 5,25 hpf)

Utilitzem el terme Blàstula per referir-nos a l'espai de temps en el que el blastodisc amb aspecte de disc es troba entre la vuitena divisió zigòtica (fins 128 cèl·lules) i la fase de gàstrula a la catorzena divisió cel·lular del zigot. (Charles B. Kimmel 1995). L'orientació de les divisions és irregular i la seva periodicitat no mostra tanta constància ni divisions conjuntes com a la fase de segmentació. Les divisions s'inicien a les cèl·lules més pròximes al pol animal i s'estenen fins les situades al pol vegetatiu (Charles B. Kimmel 1995).

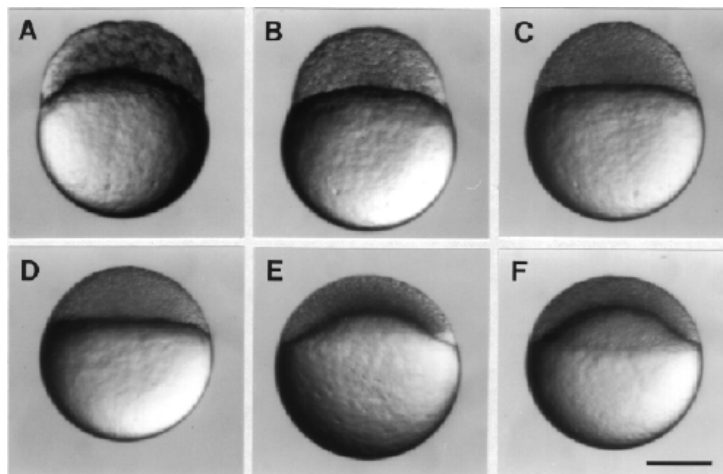


Figura 14. Formació de la Blàstula A: 256-cell stage (2.5hpf). B: 3.3 hpf. C: 3.5 hpf. D: 3.8 hpf. E:4.3 hpf. F: 4.7hpf. (Charles B. Kimmel 1995)

Gastrulació: (5 1/4 - 10 h)

Aquesta etapa comença amb una invaginació i la formació d'una cavitat doble. En aquesta fase del desenvolupament l'embrió adquireix una orientació axial amb tres capes germinals (Ectoderma, Endoderma i Mesoderma). La capa més interna o Endoderma formarà l'aparell respiratori i digestiu excepte la boca i la faringe. A la part exterior l'Ectoderma formarà el cervell i el sistema nerviós (Kimmel, Warga et al. 1994). Mitjançant processos de mitosis es desenvolupa entre l'Ectoderma i l'Endoderma el Mesoderma, que formarà la notocorda,

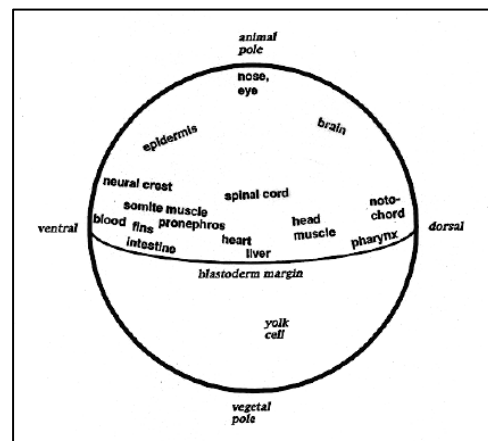


Figura 15. Mapa celular al inici de la fase de gastrulació (Charles B. Kimmel 1995)

el sistema circulatori i l'aparell excretor entre d'altres (Thisse 1993). L'interior i exterior de la gàstrula es comunica amb l'exterior mitjançant un orifici denominat blastopor que en etapes posteriors del desenvolupament formarà l'anus. Mitjançant estudis de marcatge cel·lular s'ha pogut determinar que aquesta organització cel·lular està estrictament regulada i que en anterioritat a la invaginació ja hi ha una estructuració cel·lular establerta que derivarà en la formació d'òrgans i teixits (*Figura 15*)

Fase de Segmentació (10-24hpf):

En aquesta fase apareixen un gran nombre de canvis morfològics, s'inicia una organogènesi primària, es formen els somites, la cua inicia el seu desenvolupament i l'embrió augmenta de mida i apareixen les primeres cèl·lules totalment diferenciades. Aquesta fase es caracteritza també per l'inici dels moviments periòdics involuntaris a l'embrió. L'augment progressiu de divisions longitudinals del mesoderma (els somites) proporciona l'índex estacional més útil en aquesta fase del desenvolupament. A l'inici de la fase de segmentació es formen nous somites cada 3h, temps que es va escurçant fins arribar a formar-se cada 2h al final de la fase (Hanneman and Westerfield 1989). La formació de la retina i d'altres estructures neuronals s'inicia en la fase de 20-25 somites, i a la fase final (26 somites) ja es poden observar la formació de cèl·lules sanguínies i dels otòlits. Al final de la fase de segmentació, l'embrió té 26 somites i una llargària mitjana d'1.9mm.

Estadi de faríngula (24-48)

Entre el primer i el segon dia l'embrió ja mostra una estructura bilateral i una notocorda ben desenvolupada. El sistema nerviós creix per la part anterior i es pot distingir el cervell format per cinc lòbuls ben diferenciats. En aquesta fase s'inicia la formació de les aletes pectorals, la síntesi dels pigments en la retina, la pigmentació en general i comencen els primers batecs del cor i els primers moviments reflexos. Al seu final, l'embrió té uns 2,9mm.

Eclosió (48-72h)

Aquesta és la fase en la qual els embrions es veuen alliberats de la seva cobertura o còrion. A *Danio rerio* l'eclosió no es pot considerar per sí mateixa com indicativa d'un

estat concret del desenvolupament, ja que els embrions que perden el còrion en primer lloc no es troben més desenvolupats que els que ho fan més endavant, en un procés que pot durar fins a 24 hores (Kimmel, Ballard et al. 1995). Durant aquesta fase l'embrió continua augmentant de mida a la mateixa velocitat. En aquest punt molts òrgans interns finalitzen la seva morfogènesi i els que no ho han fet completen la seva diferenciació de manera significativa. És en aquesta fase on es finalitza la formació de les aletes, les brànquies i la mandíbula. Al seu final, l'embrió té una mida de 3,3mm (Charles B. Kimmel 1995).

Eleuteoroembrió (48 ~ 72hpf – 4 ~ 5 dpf)

Aquesta fase comprèn des del punt en que l'embrió eclosiona alliberant-se del còrion fins el punt en que l'individu pot alimentar-se per si mateix assimilant aliment exogen (Belanger, Balon et al.). En aquest punt comença a augmentar el desenvolupament de les aletes i el sac vitel·lí comença a esgotar-se (Charles B. Kimmel 1995). La capacitat d'autoalimentació marca un punt a partir del qual la larva ja es considera protegida per la legislació de benestar animal; per tant, aquesta fase té una gran importància legal i operativa, ja que és la més avançada a la qual no s'apliquen les normes d'experimentació animal. Mitjançant l'estudi on s'ha alimentat a *Danio rerio* amb cultius de protozous s'ha pogut establir que aquest punt de transició se situa entre el quart i el cinquè dia després de la fertilització i mai abans del 5dpf si la temperatura d'incubació no ha superat els 25°C (Belanger, Balon et al. 2010) (Taula 3).

Taula 3: Tant per cent d'eleuteoroembrions alimentats exògenament entre els 4 i els 6 dpf's mesurat mitjançant microscopi de fluorescència. (n= 20 per grup). CND indica que la fluorescència generada per la presència de protozous a l'interior dels Zebrafish és significativament indistingible a la de l'exterior (Belanger, Balon et al. 2010).

Especies de Protozous	Dies Post Fertilització (Dpf)		
	4	5	6
Control (not feed)	0	0	0
Euplotes	0	75	80
Euglena	0	CND	CND
Paramecium aurèlia	0	85	95
Paramecium bursaria	0	75	CND
Paramecium multimucronucleatum	0	75	90

Fase Larvària (5dpf -30dpf)

Aquesta fase compren des de l'inici en el que l'embrió pot alimentar-se per si mateix fins a l'entrada en la fase juvenil al voltant dels 30 dies. En aquesta fase es produeixen un gran nombre de canvis que alguns autors cataloguen de tipus metamòrfic cap a la fase adulta. L'expressió de determinats gens pot augmentar a nivells màxims en unes poques hores i tornar a nivells basals en unes altres poques. Tots aquests canvis estructurals i genètics permeten a la larva modificar els seus òrgans i el seu metabolisme cap a la fase adulta.

1.4.1.2. L'Eix Tiroïdal de *Danio rerio* al llarg del desenvolupament

La gametogènesi és un factor clau que determinarà la qualitat dels ous i la viabilitat de les futures larves. S'ha trobat una correlació directa entre l'estat de les glàndules tiroïdals i l'augment temporal de TH coincident amb la maduració de les gònades (Eales 1996). En general és difícil interpretar aquesta correlació i no aporta evidències d'un rol directe entre l'hormona tiroïdal, la reproducció i la gametogènesi. Molt probablement aquests nivells elevats de TH durant a la reproducció són necessaris per assegurar la concentració adequada d'hormones a l'oòcit (Power, Llewellyn et al. 2001), ja que hi ha estudis que demostren que les TH s'acumulen als oòcits durant el seu desenvolupament. La presència de TH durant l'embriogènesi queda evidenciada als estudis en els quals s'han quantificat els nivells de TH als ous per RIA (Taula 4). Les T3 i T4 embrionàries són d'origen maternal, ja que en aquests estadis de desenvolupament els fol·licles tiroïdals encara no s'han desenvolupat per produir-les.

Taula 4. Concentració d'Hormona Tiroïdals mesura mitjançant RIA en extractes d'ous fertilitzats (Power, Llewellyn et al. 2001)

^a Concentració de TH expressada en ng/organisme, SD Sense Dades .

Especies	Concentració	Concentració	Autors
	T4 (ng/g)	T3 (ng/g)	
Chum salmon (<i>Oncorhynchus keta</i>)	15–20	9	de Jesús and Hirano, 1992
Tockeye salmon (<i>Oncorhynchus nerka</i>)	6a	1a	Leatherland et al., 1989a
Chinook salmon (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	4.2a	4a	Leatherland et al., 1989a
Pink salmon (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>)	1a	0.5a	Leatherland et al., 1989a
Coho salmon (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	4.5a	1.5a	Leatherland et al., 1989a
Brown trout (<i>Salmo trutta</i>)	SD	52	Mylonas et al., 1994
Striped bass	5.1	4.5	Brown et al., 1987
Tilapia	<0.25a	<0.25a	Reddy and Lâm, 1992a
Tilapia	2.1	11.4	Weber et al., 1992
Rabbitfish	10–16	2	Ayson and Lâm, 1993
Conger eel (<i>Conger myriaster</i>)	5	0.15	Yamano et al., 1991b
Sea bream	2.5	16	Authors observations

Als amfibis, les hormones tiroïdals tenen un paper fonamental a la fase larvària i són essencials a la fase de metamorfosi, controlant la degradació de teixit larval i l'organogènesi cap a la fase adulta (Shi, Wong et al. 1996). En els peixos teleostis també es poden diferenciar etapes de metamorfosi entre els estats larval i juvenil. En *Danio rerio* els canvis més evidents són externs, com la transformació de les aletes, el desenvolupament de la coloració ratllada típica dels adults i la formació d'escates a la pell. Tot i que el paper del sistema tiroïdal a la maduració dels embrions encara no es coneix, s'ha observat que l'administració exògena de TH indueix la maduració de les aletes pectorals i pèlviques i que la inhibició de la síntesi de TH per goitrògens inhibeix el pas de l'estat larvari al juvenil.



Durant els primers estadis de desenvolupament, la primera isoforma de TR que es presenta és la TR α , majoritària a *Danio rerio* en totes les etapes del seu desenvolupament, amb pics màxims d'expressió durant les fases de gàstrula i blàstula (Power, Llewellyn et al. 2001). La TR β 1 també s'expressa en els primers estadis, però sempre després de la TR α 1, i es té constància de la seva presència abans de finalitzar la fase de blàstula. Les funcions concretes de les dues isoformes en aquestes fases embrionàries són encara desconegudes.

1.4.1.3. Desenvolupament i funció de les escates.

La majoria d'escates presents en els Teleostis, incloent les de *Danio rerio*, són del tipus elasmoides (Sire and Akimenko 2004), caracteritzades per sobreposar-se unes sobre les altres, permetent una gran flexibilitat. Cobreixen la totalitat del cos, estan disposades en files longitudinals i verticals i no necessiten la formació prèvia de teixit cartilaginós. En realitat, són estructures fines de col·lagen laminar situades sobre la dermis. El seu creixement anual o estacional genera bandes que posteriorment poden servir per determinar l'edat de l'individu (Helfman 1997) (*Figura 16*)

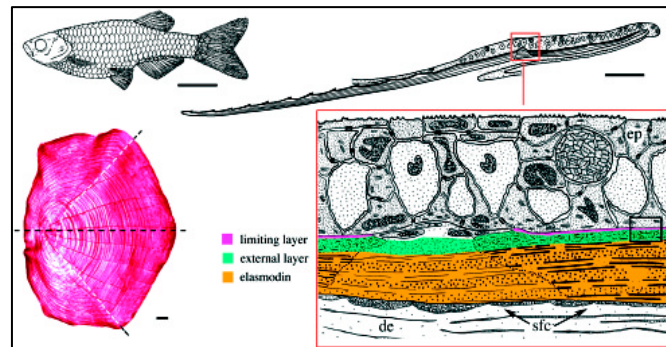


Figura 16. Vista superior i tall transversal d'escates de *Danio rerio* (Sire and Akimenko 2004).

Les escates de *Danio rerio* estan constituïdes per tres tipus de teixit:

- Capa basal: Constituïda per teixit semimineralitzat format per elasmoidina, proteïna constituïda per una sèrie de capes de fibres de col·lagen. És una estructura compacta amb una configuració molt similar al dels ossos.
- La capa externa mineralitzada: Formada per fibres de col·lagen disposades en forma de bri, encreuades amb estructura molt similar a la dentina.
- Una capa limitant, hipermineralitzada, desproveïda de col·lagen i situada a la zona més pròxima a l'epidermis.

Durant el desenvolupament, es forma primer la capa externa, seguida per la capa basal, per finalment formar-se la capa limitant (Sire and Akimenko 2004).

La formació de les escates es presenta sempre després del procés de metamorfosi de l'estat larvari cap al juvenil. Al peix zebra, el procés s'inicia normalment entre els 20 i els 26 dpf, quan els fibroblasts que posteriorment es diferenciaren en escates envaeixen l'estroma. Encara que es donen variacions individuals, tots els individus presenten escates als 30 dpf. (Sire and Akimenko 2004).

Als teleostis les funcions de les escates són nombroses. Mitjançant la seva fisiologia ofereixen protecció davant depredadors i faciliten el desplaçament dins de l'aigua reduint la fricció. A part de les funcions derivades de la seva fisiologia, en els teleostis les escates també tenen diverses funcions i alguns autors les consideren com un òrgan amb unes funcions molt similars a les del sistema ossi, com per exemple, aquelles que s'encarreguen del manteniment de l'homeòstasi del calci i el fòsfor (Vieira, Gregorio et al.)

1.4.1.4. Transport d'oxigen i sistema sanguini :

El sistema circulatori en els teleostis és tancat amb els òrgans respiratoris (brànquies) situats en sèrie amb els teixits sistèmics, assegurant un transport eficient de l'oxigen. A diferència dels vertebrats superiors com les aus o els mamífers on el cor permet separar el sistema venós de l'arterial, els teleostis disposen de quatre cambres disposades en sèrie que no ho permeten (Sinus Venós, Aurícula, ventricle i *Bulbus Arteriosus*) (Hu, Sedmera et al. 2000) El sinus venós recull la sang, el ventricle impulsa la sang i el *Bulbus Arteriosus* manté constant el flux sanguini (Icardo, Colvee et al. 1999) (*Figura 17*).

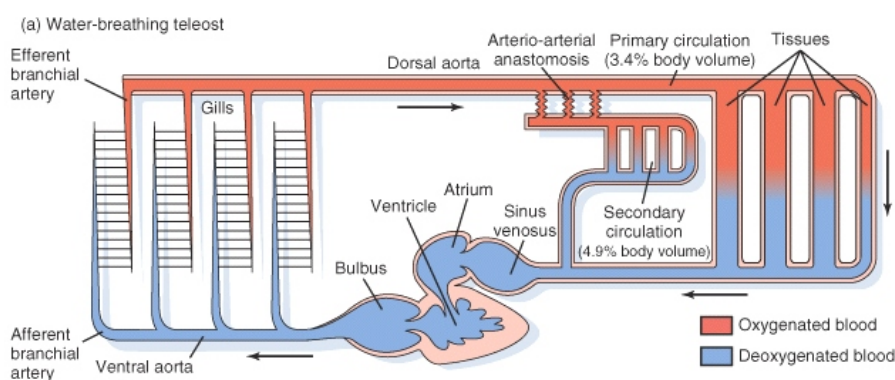


Figura 17. Sistema circulatori en teleostis. La circulació respiratòria a través de les brànquies i la circulació sistèmica estan en sèrie.

1.4.1.4.1. Globulines

L'hemoglobina és la principal proteïna responsable de l'intercanvi de gasos al sistema circulatori. Està formada per 4 subunitats (dues α i dues β), cada una d'elles unides a un grup prostètic de tipus hemo (Brownlie, Hersey et al. 2003). L'àtom de Fe situat a la part central del grup hemo és el que permet el transport i l'intercanvi d'oxigen i CO_2 .

Tots els vertebrats estudiats tenen diversos gens responsables de codificar les cadenes d'hemoglobina, i la seva expressió varia segons l'estadi de desenvolupament. Això permet que, en cada estadi, es generin diferents tipus d'hemoglobina amb diferent afinitat per l'oxigen. Un exemple d'aquesta modulació s'observa en el desenvolupament embrionari als humans, el genoma dels quals presenta dos clústers de gens, el de la β -globina (cinc gens) i el de l' α -globina (tres gens). Els diferents gens de cada clúster s'expressen seqüencialment al llarg dels diferents estadis de l'embrió i el fetus, fins arribar a l'expressió de les formes adultes (Maniatis, Fritsch et al. 1980).

En els teleostis també podem distingir entre les hemoglobines embrionàries i les adultes. La principal diferència entre aquests dos grups és que l'hemoglobina embrionària té una major afinitat a l'O₂ i un efecte Bhor menor que les adultes (Brownlie, Hersey et al. 2003). L'efecte Bhor es refereix a la capacitat de l'hemoglobina de disminuir la seva afinitat per l'oxigen a baix pH. (Brownlie, Hersey et al. 2003).

La codificació genòmica de les globines al genoma del peix zebra presenta quatre locus agrupats en parells i enfrontats entre ells (Brownlie, Hersey et al. 2003). Com als mamífers, un parell de locus codifica les cadenes α i l'altre les cadenes β (Chan, Robinson et al. 1997). Aquesta configuració suggereix que l'origen de les dues cadenes de globines es troba en la duplicació d'un únic gen (Brownlie, Hersey et al. 2003). A l'igual que succeeix en humans, a *Danio rerio* varia l'expressió/repressió d'aquests diferents gens generadors d'hemoglobines embrionàries o adultes depenent de l'estadi del desenvolupament. Fins el moment s'han caracteritzat 6 hemoglobines embrionàries (*hae1*, *hae2*, *hae3*, *hbe1*, *hbe2* i *hbe3*) i 5 adultes (*haa1*, *haa2*, *haa3*, *hba1* i *hba2*) (Chan, Robinson et al. 1997; Brownlie, Hersey et al. 2003).

Durant la fase embrionària, l'eritropoesi té lloc a la massa cel·lular intermèdia (ICM) i mitjançant tècniques d'hibridació *in situ* s'ha comprovat que a les 24 hpf ja es sintetitzen hemoglobines embrionàries (Chan, Robinson et al. 1997). A partir del 10 dpf l'eritropoesi va migrant fins que, en l'adult, la seva major part es realitza en el ronyó (Maruyama, Yasumasu et al. 2002; Paffett-Lugassy, Hsia et al. 2007).

1.4.1.5. Sistema visual

Els ulls dels vertebrats estan formats per tres estructures clarament diferenciades. Els rajos de llum entren per un estructura transparent denominada còrnea, posteriorment travessen una segona estructura en forma de lent, el cristal·lí, per acabar formant una imatge invertida sobre la tercera estructura, la retina. Als vertebrats terrestres, ni la retina ni el cristal·lí són mòbils i el procés d'enfocament es realitza mitjançant canvis de gruix i curvatura del cristal·lí. No succeeix el mateix als teleostis, on el procés d'enfocament es produeix amb el moviment del cristal·lí respecte la retina, exactament igual com fan les càmeres fotogràfiques.

La retina té la funció de captar l'energia lumínica i transformar-la en impulsos nerviosos que són enviats al cervell a través del nervi òptic. Les retines dels teleostis presenten una gran complexitat si les comparem amb les d'altres vertebrats, degut a la gran quantitat de fotopigments, i poden variar enormement entre espècies. A *Danio rerio*, com la majoria de vertebrats, la captació de la radiació electromagnètica es realitza mitjançant dos tipus cel·lulars clarament diferenciats: els cons i els bastons. Aquests dos tipus presenten diferències morfològiques i fisiològiques, ja que, per exemple, els cons actuen millor sota condicions de llum brillant i els bastons en condicions de llum escassa. El sistema visual al Peix Zebra es desenvolupa molt ràpidament i com ha resultat als 5 dpf's ja disposa d'un sistema ocular totalment desenvolupat i funcional, coincidint amb l'esgotament de les reserves del sac vitel·lí de l'embrió (Fleisch and Neuhauss 2006). Tant els cons com els bastons estan formats per una part interna que conté els orgànuls cel·lulars i una externa dedicada a la fotorecepció. El segment extern està format per discs plegats uns sobre els altres, a la membrana dels quals es trobem els fotoreceptors, (Eckert 2004). A *Danio rerio* hi ha un únic tipus de cèl·lules bastó i quatre diferents de cèl·lules tipus con: Curt Simple (SSC), Llarg Simple (LSC) i dos tipus de Cons Dobles (DC), tots ells caracteritzats pels diferents fotoreceptors que contenen (Fleisch and Neuhauss 2006). Cons i bastons transformen l'energia electromagnètica, captada pels fotoreceptors, en impulsos nerviosos, que es transmeten al nervi òptic.

Els fotoreceptors són heteroproteïnes transmembrana situades als extrems dels cons i bastons. La seva part proteica rep per nom d'opsina i s'uneix al 11-cis-retinal, derivat de la vitamina A. Les opsines dels bastons (rodopsina) i dels cons difereixen en la seva sensibilitat a la llum i en el seu espectre d'absorció de diferents longituds d'ona, especialment al cas dels cons. *Danio rerio* té diverses opsines segons la franja de l'espectre lumínic: dos pel vermell (LWS-1 i LWS-2), quatre pel verd (RH2-1, RH2-2, RH2-3 i RH2-4), una per l'ultraviolat (SWS-1), una pel blau (SWS-2) i la rodopsina, present únicament als bastons (RH1) (Takechi and Kawamura 2005) (Taula 5). Aquesta varietat d'opsines i fotoreceptors és el fonament de la visió del color, que al peix zebra és tetracròmica, vermell, verd, blau i ultraviolat (Fleisch and Neuhauss 2006).

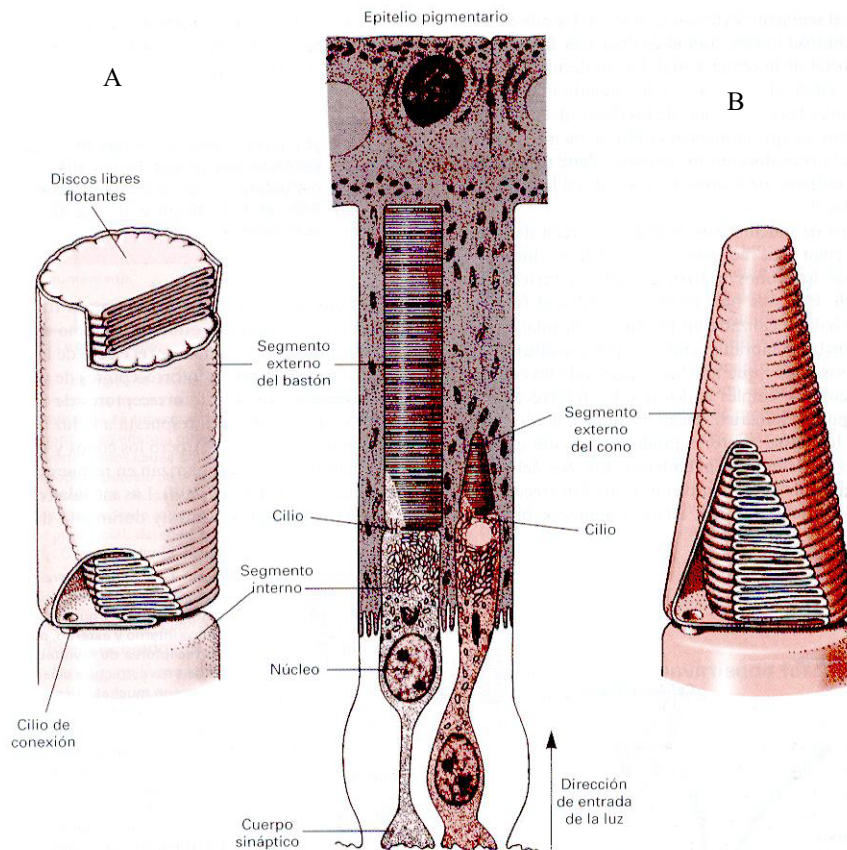


Figura 18. Els fotoreceptors dels vertebrats es classifiquen com a bastons (a) o cons (b) segons les propietats morfològiques i fisiològiques. El pigment que absorbeix l'energia lumínica es troba en la membrana de les lamines i els extrems dels segments externs descansen sobre l'epiteli pigmentari

Taula 5. Opsines presents en *Danio rerio*

Opsina	Gen Codificant	Longitud mRNA (bp's)	Espectre Lumínic	Tipus Cel·lular
LWS-1	<i>opn1lw1</i>	1699	Vermell	Cons (LSC)
LWS-2	<i>opn1lw2</i>	1642	Vermell	Cons (LSC)
RH1	<i>rho</i>	1555		Bastons
RH2-1	<i>opn1mw1</i>	1574	Verd	Cons (DC)
RH2-2	<i>opn1mw2</i>	1661	Verd	Cons (DC)
RH2-3	<i>opn1mw3</i>	1379	Verd	Cons (DC)
RH2-4	<i>opn1mw4</i>	1379	Verd	Cons (DC)
SWS-1	<i>opn1sw1</i>	1777	Ultraviolada	Cons (SSC)
SWS-2	<i>opn1sw2</i>	1413	Ultraviolada	Cons (SSC)

Els gens que codifiquen pels dos subtipus de LWS estan situats en tàndem al genoma, separats per 1,8 Kbp, de la mateixa manera que ho estan els gens pels quatre subtipus de RH2, separats 25Kbp (Takechi and Kawamura 2005). Degut a aquesta distribució dels diferents locus, es creu que els diferents subtipus d'opsines van sorgir mitjançant la duplicació del seu gen d'opsina ancestral (Takechi and Kawamura 2005).

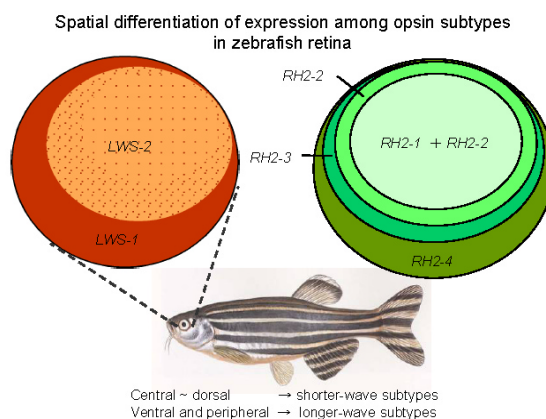


Figura 19 Diferenciació espacial de la expressió dels diferents subtipus d'opsines en la retina de *Danio rerio* (Takechi and Kawamura 2005).

L'expressió dels gens de les diferents opsines està íntimament lligada al desenvolupament de *Danio rerio* (Takechi and Kawamura 2005), d'una manera semblant a les hemoglobines embrionàries i adultes. La primera en expressar-se és l'opsina LWS-2 seguida de la LWS-1, que s'expressa en menor quantitat i d'una manera més localitzada a la retina. Aquest patró és invers al que trobem en adults, on l'expressió de LWS-1 és clarament superior a la de LWS-2. Tot i que hi ha petites variacions segons els individus, LWS-1 mai inicia la seva expressió abans dels 3 dpf.

Respecte les rodopsines, presents només en els bastons, aquestes comencen a aparèixer als 3dpf. La primera en aparèixer és la RH1-1, seguida per la RH1-2 als 7dpf. Les dues s'expressen al centre de la retina en adults. Finalment les rodopsines RH1-3 i RH1-4 inicien la seva expressió més tard, només en la perifèria de la retina i en menor quantitat que RH1-1 i RH1-2 (Takechi and Kawamura 2005).

Diversos estudis demostren que el desenvolupament del sistema visual en embrions està íntimament lligat a les condicions de llum a les que es veuen sotmesos els individus. De fet, en embrions exposats a llum o mantinguts en foscor de forma constant es produeixen variacions en el correcte desenvolupament del sistema visual que determinarà l'espectre visual a l'adult (Saszik and Bilotta 1999).

1.4.1.6. Receptor d'estrògens a *Danio rerio*.

Els receptors d'estrògens del peix zebra (zfER) són un grup de receptors cel·lulars que s'activen amb la unió del 17 β -Estradiol. Existeixen dos tipus de receptors: l'ER, intracel·lular i pertanyent a la superfamília dels receptors nuclears, i el GPR30, és un receptor de membrada del grup dels receptors acoblats a la proteïna G. A *Danio rerio* hi ha tres gens que codifiquen per dos subtipus de zfER (*esr1*, *esr2a* i *esr2b*), dels quals *esr1* codifica per la forma zfER α , mentre que *esr2a* i *esr2b* codifiquen per dues formes de Er β (zfEr β _a i zfEr β _b) (Tingaud-Sequeira, Andre et al. 2004).

A *Danio rerio* el receptor d'estrògens, a l'igual que tots els membres de la família dels receptors nuclears, consta de cinc dominis estructurals (*Secció 1.3.3*)(Nilsson, Makela et al. 2001). El Domini DBD té un paper molt important en els processos de dimerització del receptor i d'unió a les seqüències específiques al DNA (Estrogen Response Element, ERE) (Menuet, Pellegrini et al. 2002). Els elements ERE són seqüències curtes i palindròmiques situades a prop de les seqüències d'inici dels gens diana, en la zona denominada com a promotor (Mueller 2004). El domini d'unió a lligand (LBD) presenta una gran homologia entre zfER α i zfEr β (Kuiper, Carlsson et al. 1997) i permet la interacció amb els lligands específics per al zfER com l'estradiol (Nilsson, Makela et al. 2001).

En la seva forma inactiva i amb absència dels seus lligands específics, el receptor es troba en el citoplasma com a monòmer associat a sp 90 (Heat Shock Protein). Al produir-se l'activació mitjançant la unió del lligand a LBD es produeix un canvi conformacional en zfER que permetrà la seva dimerització formant homodímers ($\beta\beta$, $\alpha\alpha$) o heterodímers ($\beta\alpha$) (Xiaodong Li 2004). Com a dímer es transloca a l'interior del nucli, on mitjançant la unió a diversos coreguladors com el SRC-1, s'unirà als elements ERE activant l'expressió de determinats gens (McKenna, Lanz et al. 1999) .

1.4.1.7. Processos involucrats en el metabolisme dels xenobiòtics a *Danio rerio*

D'entre els molts enzims encarregats de metabolitzar els xenobiòtics als vertebrats, en aquest estudi ens hem centrat principalment en l'enzim Cyp1a i les proteïnes denominades metal·lotioneïnes.

1.4.1.7.1. Citocrom Cyp1a a *Danio rerio*.

El Cyp1a és una heteroproteïna que pertany a la superfamília dels citocroms p450 i és el principal responsable del metabolisme oxidatiu dels xenobiòtics. Els citocroms P450 són presents a bacteris, arqueobacteris i eucariotes (Danielson 2001), formant part de cadenes de transferència d'electrons. La reacció més comuna és la monooxigenació, on un àtom d'una molècula d'oxigen (O₂) s'afegeix a un substrat orgànic a la vegada que l'altre àtom d'oxigen es redueix a aigua. El Cyp1a té un paper molt important a la biotransformació de xenobiòtics com dioxines, furans, PCB i PAH (Stegeman, Woodin et al. 1990).

A *Danio rerio*, l'expressió gènica del gen *cyp1a* està regulada pel Receptor d'hidrocarbur d'Aril (AhR), responsable de la regulació d'un gran nombre de gens encarregats del metabolisme de xenobiòtics (Poland and Knutson 1982; Denison and Heath-Pagliuso 1998). L'AhR pertany a la família de reguladors transcripcionals bàsics Hèlix-Loop-Hèlix/Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS i té una elevada afinitat per diversos xenobiòtics, incloent alguns PAH, alguns PCB, dibenzofurans o dioxines entre d'altres (Burbach, Poland et al. 1992; Denison, Pandini et al. 2002).

AhR presenta el motiu de bHLH, a l'extrem N-terminal, que permet la unió del receptor a les seqüències específiques de DNA (Xenobiotic Response Elements, XRE). i presenta els Senyals de Localització Nuclear (NLS, Nuclear Location Sequence) i d'Exportació Nuclear (NES, Nuclear Export Sequence) que regulen la translocació al nucli (Coumailleau, Poellinger et al. 1995). Els dominis PAS permeten l'heterodimerització amb l'ARNt (AhR nuclear translocator) o amb la HSP90 (Heat Shock Protein90).

Els contaminants difonen per la membrana plasmàtica i s'uneixen al AhR, que en la seva forma inactiva es troba el compartiment citosòlic unit a un complex proteic constituït per un dímer de hsp90, una Xaperona (XAP2) i la prostaglandina E-Sintasa 3 (p23). Les funcions d'aquest complex són múltiples, p23 protegeix l'AhR de la proteòlisi i XAP2 s'uneix a AhR per la Seqüència de Localització Nuclear (NLS), evitant la seva translocació al nucli (Denison and Heath-Pagliuso 1998; Meyer, Pray-Grant et al. 1998). Al produir-se la unió de AhR amb el seu lligand mitjançant el domini LBD es produeix un canvi conformacional alliberant-lo del complex proteic i exposant

els dominis encarregats de la unió al ARNt i de translocació al nucli. (Denison, Pandini et al. 2002). Després de translocar-se al nucli, l'heterodímer AhR:ARNT, conjuntament amb altres coactivadors com CBP, P300 i RIP140, permet la transcripció de determinats gens associats a les seqüències XRE (Denison and Heath-Pagliuso 1998).

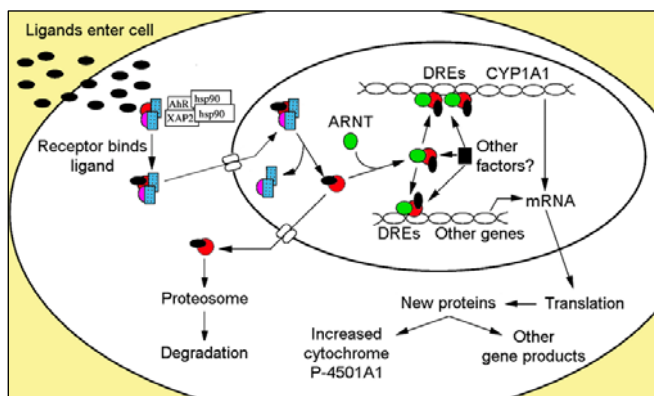


Figura 20. Mecanismes d'activació de l'Ahr (Denison and Heath-Pagliuso 1998).

Els lligands clàssics del AhR es caracteritzen per contenir anells aromàtics amb una estructura planar que els permet unir-se al LBD del receptor. Molècules que no s'ajusten del tot a aquesta estructura poden interactuar amb AhR, activant la transcripció dels gens propers a les zones XRE

(Boronat 2009). La relació directa entre la presència de determinats contaminants i l'expressió de Cyp1a als vertebrats ha estat àmpliament demostrada en diversos sistemes. A la Figura 21 és poden observar la resposta obtinguda en els nivells de Cyp1a en un recull de 48 experiments de camp i 60 fets al laboratori.

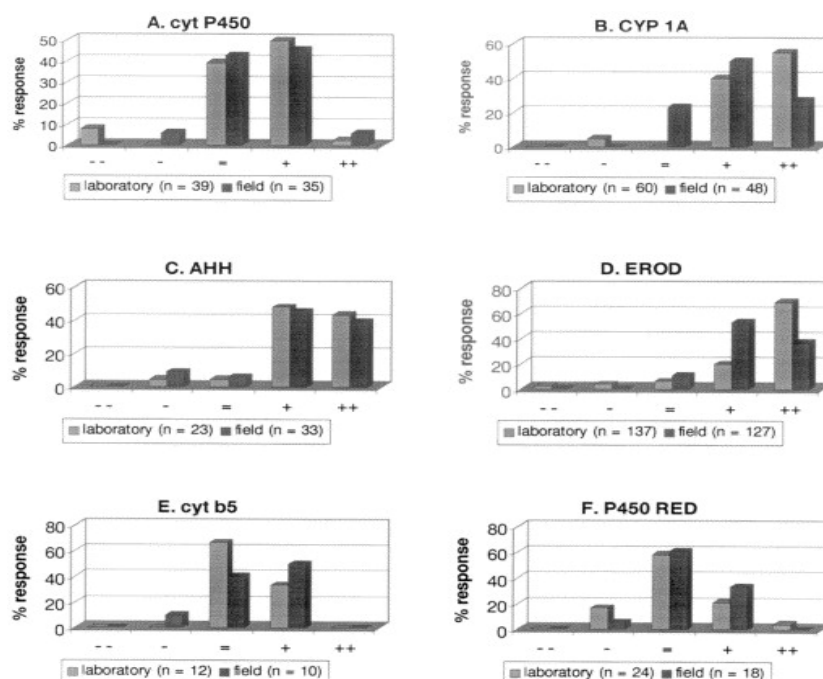


Figura 21. Freqüències de la inducció de contaminants de respostes sobre diversos enzims de Fase I a peixos: (A) Cytochrome P450; (B) Cytochrome P450 1A (CYP1A); (C) aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH); (D) ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD); (E) cytochrome *b*₅ (cyt *b*₅); (F) cytochrome P450 (c) reductase (P450 RED). (van der Oost, Beyer et al. 2003).

Les dades mostren un augment significatiu dels nivells de Cyp1a al 91% dels estudis de laboratori i del 85% en els de camp. La inducció de Cyp1a és de més de 500 vegades al 43% dels casos en els estudis de camp i 39% dels de laboratori (van der Oost, Beyer et al. 2003). Fins al moment, totes les espècies estudiades de vertebrats han demostrat una alta sensibilitat de Cyp1A com a biomarcador per determinats contaminants de tipus PAH i HAH.

Al tractar-se d'un enzim metabolitzant de tipus I, teòricament el teixit diana idoni per realitzar estudis ha de ser el fetge. En realitat, Cyp1a presenta expressió a la majoria, sinó a tots els teixits presents en els peixos, i diferents estudis han demostrat que els teixits diana idonis, són simplement, aquells que han estat més en contacte amb el contaminant, com per exemple les brànquies o l'intestí.

1.4.1.7.2. Les Metal·lotioneïnes a *Danio rerio*.

Els ions metàl·lics juguen un rol molt important a nivell cel·lular funcionant com a elements estructurals de les proteïnes o com a cofactors a reaccions catalitzades enzimàticament (Coleman 1992). L'homeòstasi dels ions de zinc, coure i ferro és essencial per un correcte funcionament metabòlic cel·lular, mentre que altres ions estructuralment semblants, com el mercuri (II) o el cadmi (II), no tenen cap funció a nivell cel·lular, presenten una gran capacitat tòxica i han de ser expulsats o neutralitzats (O'Halloran 1993).

Tots els organismes han desenvolupat mecanismes de recirculació de ions metàl·lics que s'activen o es desactiven depenent de la seva disponibilitat. Davant una deficiència d'un ió metàl·lic específic s'inicia o augmenta la transcripció de gens que codifiquen per proteïnes de membrana i citosòliques de transport intracel·lular per tal d'aprofitar els metalls presents a l'ambient (Coleman 1992). Per altra banda, i davant condicions d'excés de ions metàl·lics potencialment tòxics, s'inicia o augmenta l'expressió de bombes d'expulsió cel·lulars específiques, com l'ATPasa Tipus P, que funcionen com a transportadors de membrana. Una altra estratègia és la d'expressar proteïnes segrestadores de metalls, com les Metal·lotioneïnes (MT). Per exemple, als vertebrats l'homeòstasi del zinc es manté a nivell cel·lular en gran part per la regulació zinc-dependent de la transcripció de les MT.

Les MT van ser descobertes per Vallee i Margoshe al purificar una proteïna unida a cadmi de l'escorça renal equina. Són proteïnes citoplasmàtiques de baix pes molecular (6-7 KDa) amb la capacitat d'unió a metalls pesats mitjançant el grup tiol (-SH) dels seus múltiples residus cisteïna, que arriben a representar el 30% dels seus aminoàcids (Cherian, Jayasurya et al. 2003). En mamífers s'han descrit quatre isoformes conegudes (I, II, III i IV). La I i la II tenen presència en tot l'organisme, la isoforma II es presenta al cervell i la IV és específica de cèl·lules epitelials de determinats òrgans com la llengua i la pell. (Quaife, Findley et al. 1994; Sato and Kondoh 2002). En els ciprínids les metal·lotioneïnes s'agrupen en dues isoformes (I i III), que es distingeixen principalment per la seva composició en aminoàcids, encara que no se sap si aquestes diferències tenen conseqüències funcionals (Wu, Zheng et al. 2008).

Les proves realitzades amb cèl·lules embrionàries de ratolins sense els gens (knock-out) MT-I i MT-II demostren que ambdós tenen un paper molt important en la protecció contra el Zn o el Cd, així com contra l'estrès oxidatiu (Kondo Y 1995; Lazo, Kondo et al. 1995). Aquesta regulació requereix la unió del factor de transcripció MRE-Binding Transcriptional Factor-1 (MTF-1) al Metal Response Element (MRE) del promotor dels diferents gens de les MT.

En humans i ratolins, MTF-1 pesa al voltant de 80KDa i conté sis dits de zinc i múltiples dominis d'activació transcripcional. El procés de regulació de les MT es basa en la presència de metalls com el Zn, Cd, Hg, Cu, Pb Ag i Bi, els quals tenen la capacitat d'unir-se a les MT i degut a l'estrès oxidatiu (*Figura 21*).

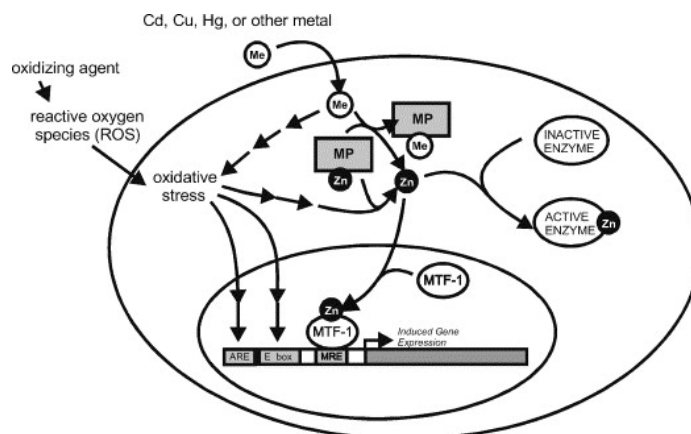


Figura 21. Procés de regulació de les MT sota la presència de metalls pesants i estrès oxidatiu.

A *Danio rerio*, como a tots els teleostis, la regió promotora està formada per diverses seqüències específiques anomenades “elements de resposta a metalls” (MRE), organitzats en clústers. De forma natural, el Zn cel·lular es troba unit a les MT. Si per motius externs augmenta la concentració de Zn o d’altres metalls pesants, aquests desplacen el Zn de la MT (Haq, Mahoney et al. 2003). El Zn lliure resultant s’uneix al factor de transcripció MTF-1, incrementant la seva capacitat d’unió als MRE i provocant un augment de la transcripció de les MT (Palmiter 1994).

Els agents amb la capacitat de formar radicals lliures i les espècies radioactives d’oxigen (ROS) també són inductors coneguts de l’expressió de les MT en rosegadors (Haq, Mahoney et al. 2003). A *Carassius auratus* s’ha pogut relacionar un excés de metalls pesants a l’interior cel·lular amb la formació (ROS) que poden provocar oxidació de proteïnes, d’anys al DNA i a les membranes cel·lulars, afectant a la viabilitat cel·lular (Choi, An et al. 2007). La inducció per estrès oxidatiu de les MT està lligat a les regions del DNA conegudes com Antioxidant Respones Element (ARE) amb combinació de les regions MRE (Haq, Mahoney et al. 2003).

1.4.8. Metabolisme lipídic a *Danio rerio*

Els lípids (lipos "greix" + eĩdos "aparença, figura") són biomolècules hidrofòbiques i amfifíliques (Berg 2008) que, a diferència dels glúcids i les proteïnes, no tenen cap grup funcional propi i l’única característica comuna que comparteixen és la seva solubilitat en dissolvents orgànics no polars (benzè, èter dietílic,...). Els lípids constitueixen un ampli grup de molècules que inclouen els greixos, ceres, esterols, vitamines liposolubles (com les vitamines A, D, E, i K), monoglicèrids, diglicèrids, triglicèrids, fosfolípids i d’altres. Les principals funcions dels lípids inclouen l’emmagatzematge d’energia, funcions estructurals a la membrana cel·lular, senyalització molecular, etc. (Subramaniam, Fahy et al.) La gran importància metabòlica d’aquests ha provocat que, al llarg de l’evolució, els organismes hagin adquirit un gran nombre de mecanismes altament eficaços per la seva captació, regulació i excreció. Per exemple, l’aparició d’un tipus cel·lular exclusiu als metazous, els adipòcits, amb la funció d’emmagatzemar-los per tal de ser alliberats en el moment necessari. A la vegada, existeixen un gran nombre de proteïnes reguladores amb multitud de funcions, com la captació d’àcids grassos provinents de la dieta, transport sanguini, transport limfàtic, transportadors cel·lulars, etc.

Les Fatty Acid Binding Protein (FABPs) constitueixen una família de proteïnes citoplasmàtiques de baix pes molecular involucrades amb el transport i metabolisme intracel·lular dels àcids grassos (AG), de cadena llarga (Cecilia Albala 2006). Actualment a *Danio rerio* s'han descrit tres proteïnes del tipus FABP identificades i numerades segons el teixit on s'expressen (Her, Yeh et al. 2004).

Taula 6. Proteïnes FABP Identificades a *Danio rerio*

Proteïna	Gen	Òrgan d'expressió
L-FABP	<i>Fabp1</i>	Fetge
I-FABP	<i>Fabp2</i>	Intestí
B-FABP	<i>Fabp7</i>	Cervell

El gen *fabp2* s'expressa únicament i uniformement a totes les cèl·lules de l'epiteli intestinal on s'encarrega del transport dels AG des de la membrana plasmàtica fins el reticle endoplasmàtic rugós, on seran esterificats amb gliceril 3 fosfat per formar triglicèrids (TG) que posteriorment s'emmagatzemaran per ser transportats de nou al plasma (Cecilia Albala 2006). Tot i que el seu paper no està totalment esclarit, les hipòtesis sobre les funcions de la FABP2 inclouen la neutralització dels AG, minimitzant els seus efectes tòxics a l'interactuar amb membranes o soluts cel·lulars, la regulació de la síntesis i secreció dels lípids de les cèl·lules intestinals i regulació de l'expressió gènica del receptor PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) que té com a lligands naturals els propis AG poliinsaturats (Cecilia Albala 2006).

La Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP) és una heteroproteïna essencial en la formació de les lipoproteïnes. Més concretament, els triacilglicèrids, el colesterol lliure, els èsters de colesterol i els fosfolípids són combinats amb l'Apob-48 (Apolipoprotein B-48) per permetre el seu transport pel sistema limfàtic (Stainier 2006). Durant el desenvolupament de *Danio rerio*, la MTP s'expressa en grans quantitats en el fetge, l'intestí i la capa externa del sac vitel·lí (Marza, Barthe et al. 2005). Mitjançant individus *knock out* pel gen *mtp* s'ha pogut comprovar que aquesta heteroproteïna té un paper fonamental en la captació de lípids provinents del sac vitel·lí i la seva deficiència provoca una disminució en el consum de les reserves energètiques, un retràs en el desenvolupament, una significativa disminució de la mida i finalment la mort de l'eluteroembrió (Stainier 2006). En humans, les mutacions o delecions que generen el mal funcionament de la proteïna MTP provoquen la incorrecta absorció dels àcids

grassos en el tracte intestinal i desenvolupen la malaltia denominada com abetalipoproteinemia, més coneguda com Síndrome de Bassen-Kornzweig. Els individus, normalment homes, que pateixen aquesta malaltia produeixen femtes grasses, tenen deficiències en el desenvolupament infantil i problemes en el sistema nerviós (Wetterau, Aggerbeck et al. 1992).

1.4.2 *Cyprinus carpio*

La carpa comuna (*Cyprinus carpio*) és un peix omnívor d'aigua dolça que s'alimenta de



detritus orgànics, larves, insectes, algues microscòpiques, crustacis i mol·luscs disposats al sediment. Prefereix grans masses d'aigua amb poc corrent i substrats tous. Per aquest motiu, és freqüent als trams baixos dels rius, als aiguamolls i embassaments. És un peix robust i de gran mida que pot arribar a fer més de 1m de longitud i sobrepassar els 30 kg de pes. La forma

del cos és molt variable, en funció parcialment del tipus d'ambient aquàtic ocupat, tot i que en general tendeix a ésser alt i comprimit. Els mascles tenen l'aleta ventral més llarga que les femelles i en època de reproducció mostren nombrosos petits tubercles nupcials escampats pel cap i el cos. El color i la mida és molt variable, especialment en els exemplars domèstics. S'han descrit tres subespècies en base als patrons que segueixen les escames:

- *C. carpio communis*: Les escames són concèntriques regulars.
- *C. carpio specularis*: Les escames formen una filera a ambdós costats i la resta del cos està nu.
- *C. carpio coiaceus*: Poques o cap escama a l'esquena i pell molt fina.

La reproducció d'aquesta espècie té lloc entre els mesos d'abril i juny, en aigües tranquil·les, a prop de la vora del riu i amb presència d'abundant vegetació. Els ous són dipositats a la vegetació eclosionant als 4-5 dies.

D'origen eurasiàtic, actualment es troba introduït en tots els continents excepte a l'Antàrtica. A Europa es va introduir entre els segles XI i XII. Aquesta ampla difusió es deu a la seva elevada capacitat d'adaptació i el seu ampli rang de tolerància ambiental. De fet, és molt resistent a la contaminació orgànica i a baixes concentracions d'oxigen a l'aigua. La seva ampla distribució el converteixen en un candidat ideal pels estudis de biomonitorització, de fet ja ha estat utilitzat per tal efectes en diversos estudis de la Conca del riu Ebre (Lavado, Thibaut et al. 2004)

1.4.3. *Ardea purpurea*

L'Agro roig (*Ardea purpurea*) és un ocell de la família dels ardeïds de gran mida, amb una altura de 70-90 cm i una envergadura de 110-145 cm amb les ales esteses. Aquest Ardeïd és un migrador transsaharià que hiverna a l'Àfrica tropical i que es pot trobar amb certa freqüència al centre-sud d'Europa i a l'Àsia meridional i oriental. A les nostres latituds només habita entre març i octubre. Cria formant colònies als



canyissars o als arbres propers a grans llacs i aiguamolls. Com totes els Ardeïds té un vol característic lent que realitza sempre amb el seu coll encongint. La seva alimentació es basa principalment de peixos, granotes, insectes i petits mamífers que pugui trobar en aigües poc profundes. Tendeix a estar entre els canyissars, sovint de manera discreta, tot i la seva mida.

La utilització d'aus aquàtiques per a la monitorització de contaminants es realitza des dels anys 70. Inicialment només s'utilitzava la presència dels contaminants en ous (Pastor, Jover et al. 1995), però actualment el material més emprat pels estudis són la sang i les plomes. Existeixen multitud de paràmetres que ens permeten interpretar l'impacte que han pogut patir com a conseqüència del contacte amb diversos contaminants: observació de danys al DNA, estrès oxidatiu, concentració de contaminants en teixits, inducció de biomarcadors gènics; a més d'efectes a nivells superiors d'organització com modificacions en el creixement o canvis en la distribució de poblacions, etc.

En el cas de les aus migratòries és molt interessant realitzar les anàlisis dels polls, ja que facilita enormement la interpretació dels resultats. Això es deu a què els polls són alimentats amb preses caçades als voltants de la colònia, pel que els resultats mostren únicament l'impacte dels contaminants localitzats en una zona determinada al voltant del niu. Un altre avantatge és el fet de poder determinar l'edat dels polls de manera relativament fàcil ja que tots ells solen eclosionar practicament alhora, permetent eliminar l'efecte de bioacumulació i les seves possibles interaccions en els resultats. En el nostre cas, les cries d'*Ardea purpurea*, tot i ser nidífugues, es mantenen en el niu durant un espai de temps suficient per fer les tasques de mostreig.

1.4.3.1 Detecció d'elements genotòxics en aus

La presència de contaminants orgànics amb activitat genotòxica a les aigües naturals, així com llur possible incidència en la salut humana, és un fet que preocupa cada cop més els diferents organismes que s'ocupen de vetllar per la conservació del medi i per la salut. Arreu del món, els mètodes d'estudi de l'activitat genotòxica es centren actualment en dues línies principals d'investigació: els assaigs a llarg termini i els assaigs a curt termini. Els primers, tot i tenir una alta fiabilitat, comporten un gran cost econòmic i un llarg temps d'experimentació i comprovació. Aquest elevat cost en temps, animals i material, ha encoratjat la recerca de nous sistemes que poden donar resultats comparables. Existeixen un gran nombre de proves que permeten la identificació de compostos genotòxics, com alguns tests bacterians com el Test Ames o el test SOS/umu (Ames, Lee et al. 1973; Yasunaga, Kiyonari et al. 2004; Yasunaga, Kiyonari et al. 2006), tests amb llevats (Boronat and Pina 2006), o bé mitjançant la detecció de lesions en el DNA i/o les seves conseqüències, com en el cas de la comptabilització de micronuclis.

1.4.3.2. Els micronuclis com a biomarcadors en *Ardea purpurea*

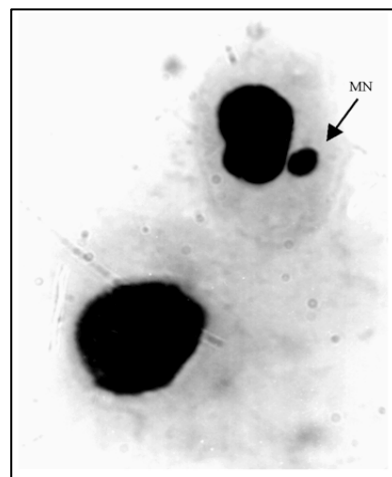
Els biomarcadors de dany al DNA són eines vàlides per a l'avaluació d'efectes d'exposició crònica o aguda d'organismes a substàncies genotòxiques (Ayllon and Garcia-Vazquez 2000). Existeixen multitud de processos mitjançant els quals els compostos poden interactuar amb el DNA. Alguns d'ells ho fan directament i altres ho poden fer a través dels seus metabòlits generats per l'acció del propi metabolisme cel·lular.

En realitat, la capacitat de produir danys i alteracions en la replicació del DNA depèn, fonamentalment, de l'activació de compostos neutres per part de substàncies oxidants, com els peròxids o com efecte secundari de l'acció dels enzims del metabolisme de detoxificació de fase I, com el Citocrom p450, que genera molècules amb la capacitat de formar unions covalents d'alta afinitat amb el material gènic generant adductes. L'acció de determinats enzims de la Fase II del metabolisme de detoxificació com les GSH i la GST permeten l'eliminació d'aquests electròlits altament tòxics a nivell cel·lular. De fet, s'ha comprovat la relació directa entre la deficiència en la seva expressió o acció amb la aparició de tumors. Els adductes poden estimular el dany oxidatiu o produir modificacions secundàries mitjançant canvis de bases o trencament de les cadenes, induint un gran nombre de problemes en la replicació del DNA. Com a resultat poden aparèixer aberracions cromosòmiques, bescanvi de cromàtides germanes aneuploidies o la formació de micronuclis (Monserrat, Martínez et al. 2007).

Els micronuclis són petites estructures derivades del nucli de les cèl·lules. De fet, són fragments cromosòmics generats pel trencament dels ponts anafàsics que s'acaben separant de la resta de material genètic al final de la mitosi (Terradas, Martín et al. 2009). Són un dels indicadors més emprats per estudiar la presència d'instabilitat cromosòmica. El primer mecanisme descrit sobre la formació de micronuclis es va desprendre d'un experiment realitzat l'any 1977 per Heddle i Carrano (Heddle and Carrano 1977). Aquests investigadors varen observar que després de l'exposició de les cèl·lules a radiacions ionitzants, i després d'un cicle de divisió, les cèl·lules presentaven micronuclis. Tenint en compte que la radiació ionitzant genera trencaments al DNA, es va poder determinar que els micronuclis originats contenien fragments cromosòmics de tipus acèntric derivats de trencaments no reparats. Uns anys més tard, Ford i col·laboradors van observar que els micronuclis contenien cromosomes sencers derivats d'una mala segregació durant la mitosi (Ayllon and Garcia-Vazquez 2000). Finalment, els micronuclis també poden contenir double minutes (DM). Els DM són petits fragments cromosòmics circulars sense centròmers ni telòmers, als que els manca un centròmer actiu i els telòmers, però la seva característica principal és que contenen gens altament amplificats, sovint relacionats amb fenotips cancerígens. Anys més tard, Gisselsson i col·laboradors varen suggerir que la presència de micronuclis i altres anomalies nuclears de tipus morfològic estan estretament lligades a les aberracions

mitòtiques generades com a conseqüència dels cicles de trencament, fusió i pont (BFB, breakage-fusion-bridge). A principis de l'any 2000 es va començar a utilitzar la quantificació de micronuclis en eritròcits en diverses espècies, incloent els ocells, per determinar la presència de contaminants genotòxics a l'ambient (Kim, Kim et al. 2003; Quiros, Ruiz et al. 2008; Barata, Fabregat et al. 2010)

El test de comptatge de micronuclis presenta una alta simplicitat i fiabilitat. A més, la seva metodologia és relativament simple en comparació a altres tests de genotoxicitat. El seu ús en l'avaluació de la toxicitat aquàtica és molt extens ja que permet l'obtenció de forma més ràpida i fiable que l'avaluació de cromàtides germanes o l'estudi d'aberracions cromosòmiques. El principal problema que presenta el comptatge de micronuclis és la possible manca de sensibilitat derivada d'una baixa freqüència de la seva presència en animals salvatges; per tal de solucionar aquest problema s'analitzen els tipus cel·lulars amb un alt índex mitòtic, com els eritròcits perifèrics (Ayllon and Garcia-Vazquez 2000).



Micronuclis (MN) presents en eritròcits de *R. catesbaiana* després de patir una exposició a lambda-cyhalothrin (Campanal, Panzeri, et al. 2003)

1.5. Bioassais i tècniques de monitorització ambiental

Les tècniques de monitorització ambiental són eines estandarditzades que ajuden a entendre i gestionar possibles impactes del xenobiòtics en el medi mitjançant el control de determinats factors químics o biològics dins d'un espai de temps determinat, amb la finalitat d'establir les possibles estratègies de futur per tal de millorar o mantenir determinats estàndards mediambientals.

Existeixen cinc metodologies ben diferenciades de monitorització ambiental (van der Oost, Beyer et al. 2003):

1. Monitorització química: Mitjançant la mesura dels nivells de contaminants prèviament coneguts.

2. Monitorització de la bioacumulació: Mesura de la presència d'un contaminant mitjançant els seus nivells presents en la biota.
3. Monitorització d'efectes biològics: Detecció dels efectes adversos primerencs, parcialment o plenament reversibles.
4. Monitorització clínica: Estudi de l'aparició de malalties concretes o danys als teixits dels organismes (irreversibles o difícilment reversibles).
5. Monitorització ecològica: Mitjançant la utilització d'eines ecològiques com poden ser la composició en espècies, la seva densitat poblacional, etc.

Tot i que la definició de la UNEP inclou un gran nombre de tècniques, fins fa pocs anys els únics estudis realitzats per la monitorització ambiental estaven fonamentats en l'anàlisi química o anàlisi poblacional i d'espècies bioindicadores. A mida que ha augmentat el nombre de substàncies i la seva diversitat estructural al llarg d'aquests últims anys, els estudis químics han deixat constància de certes deficiències impossibles de superar degudes a la seva metodologia intrínseca. D'altra banda, els estudis de bioindicadors és lent i de gran complexitat.

L'augment en el nombre de substàncies esdevé particularment problemàtic per diversos factors. En primer lloc, al tractar-se de substàncies noves, es desconeixen els seus efectes tòxics directes sobre la totalitat de la biota exposada. D'altra banda, la contaminació no només té efectes directes sobre els organismes, sinó que pot tenir efectes indirectes i a llarg termini. Això és impossible de predir quan una substància nova apareix, donat que els seus efectes poden ser deguts a la seva combinació amb altres compostos, a la seva bioacumulació, o potser causats pels seus metabòlits.

Davant aquesta allau creixent de productes ens trobem amb la necessitat de plantejar nous sistemes d'anàlisi que ens permetin visualitzar directa o indirectament la presència de substàncies en el medi, valorant no només el temps que hi estiguin o la seva concentració, sinó també els possibles efectes que causen a l'ecosistema.

En aquest punt és on els bioassaigs prenen una gran importància. Denominem bioassaig el procés de determinar la potència d'una substància o d'un material a partir de les respostes produïdes en organismes biològics. Actualment la normativa europea en la que s'estableix el marc comunitari per l'actuació en l'àmbit de les polítiques de l'aigua (DO L327 de 22.12.2000, p.1) especifica que les anàlisis per determinar els estats ecològics de l'aigua es tenen que portar a terme mitjançant la utilització d'indicadors biològics i químics (WFD 2000). Per tal de poder realitzar els bioassaigs per monitorització ambiental és necessària la utilització de bioindicadors i/o biomarcadors.

1.5.1 Els bioindicadors i biomarcadors:

Un bioindicador o indicador biològic és una espècie (espècie indicadora) o grup d'espècies que reflecteixen fàcilment l'estat biòtic o abiòtic del medi ambient, l'impacte produït sobre un hàbitat, comunitat o ecosistema, o també indiquen la diversitat d'un conjunt de taxons o biodiversitat en general d'una regió o hàbitat. Poden ser organismes tan variats com bacteris, protozous, líquens, insectes, aus o mamífers, dels que es fa un seguiment i s'infereix l'estat d'un ecosistema o del medi ambient allà on es troben. Els canvis observats en aquests organismes, poden ser genètics, bioquímics, fisiològics, morfològics, compartimentats o ecològics.

Els biomarcadors són paràmetres biològics quantificables que es poden utilitzar com indicadors de l'estat biològic d'un organisme. Aquests paràmetres es poden mesurar a nivell molecular, bioquímic o cel·lular, escala a la qual sol tenir lloc la interacció inicial entre el xenobiòtic i l'organisme (McCarthy 1990). La detecció de l'exposició i el grau de resposta de l'organisme a les substàncies tòxiques es pot fer tant en poblacions naturals provinents d'habitats contaminats, com en organismes exposats experimentalment.

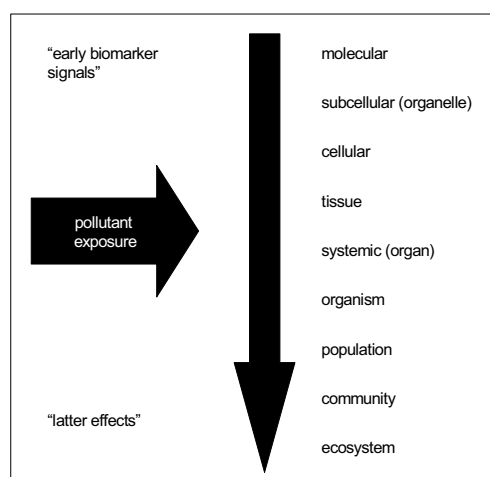


Figura 22. Resposta seqüencial d'un organisme a un contaminant (B.L Bayne 1985)

La idoneïtat de la utilització dels biomarcadors a escala molecular ha estat analitzada des dels seus inicis. Els biomarcadors que reflecteixen els estats de salut dels

organismes a nivells inferiors d'organització biològica responen més ràpidament a l'exposició a contaminants que els biomarcadors de nivells superiors, que, pel contrari, tenen una major rellevància ecològica.

Hi ha diversos factors que determinen la utilització d'un element com a biomarcador. Fonamentalment, els biomarcadors han de ser reproduïbles, sensibles i específics, així com reversibles. A més d'aquestes característiques, a un biomarcador se li valora molt positivament que tingui un temps de resposta curt i, a poder ser, que tingui una relació cost/efectivitat adient, tot i que aquestes dues característiques no són fonamentals.

Podem dividir els biomarcadors en tres tipus clarament diferenciats:

Biomarcadors d'exposició:

Permeten la detecció i mesura d'una substància exògena, un metabòlit o el producte d'una interacció entre un xenobiòtic i una molècula o cèl·lula receptora.

Biomarcadors d'efecte:

Inclou canvis bioquímics, fisiològics o d'altres que permetin la mesura del dany sofert per un organisme degut a un xenobiòtic.

Biomarcadors de susceptibilitat:

Indiquen la capacitat innata o adquirida d'un organisme a respondre a l'efecte d'un xenobiòtic.

Els estudis presentats en aquest treball s'han fonamentat en la utilització de biomarcadors d'expressió gènica, és a dir, basats en la mesura de l'expressió de gens sensibles a la presència de certs xenobiòtics, mitjançant la utilització de tècniques com la PCR en temps real i xips de DNA o microarrays.

1.5.2 PCR quantitativa en temps real

La PCR quantitativa en temps real (qRT-PCR) és una variació de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) utilitzada per amplificar i, simultàniament, quantificar el producte de l'amplificació del DNA (amplicó). Per portar-la a terme són necessaris els mateixos elements que en una PCR convencional: un motlle de DNA, uns encebadors

específics, nucleòtids, un tampó i una DNA polimerasa termostable. Donat que en la qRT-PCR es vol detectar la formació de l'amplicó a temps real, a diferència de la PCR convencional, on el producte de la reacció es detecta al final, és imprescindible afegir a la mescla de reacció un reactiu fluorescent, el senyal del qual sigui proporcional al nombre de molècules d'amplicó acumulades en cada cicle.

Hi ha un gran nombre de fluorocroms comercialitzats, però en aquest estudi s'ha seleccionat el SYBR Green® degut a la seva gran adaptabilitat. Aquesta molècula s'intercala al solc menor de la doble hèlix del DNA, formant un complex fluorescent DNA-SYBR green, que té un pic d'absorció a $\lambda=498\text{nm}$ i d'emissió a $\lambda=522\text{nm}$.

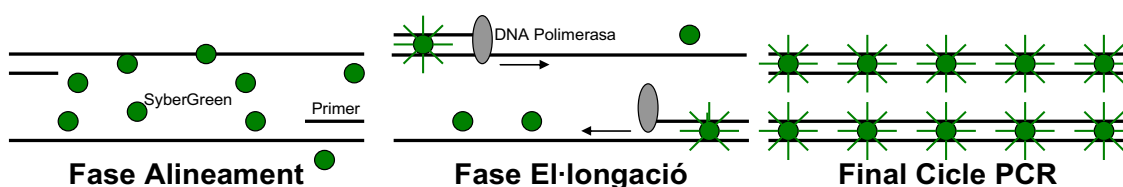


Figura 24. La molècula de SybGreen s'intercala a dins la doble hèlix de DNA, augmentant considerablement la seva emissió de fluorescència

1.5.2.1. Quantificació de l'expressió gènica

La qRT-PCR permet quantificar el número de còpies d'una seqüència específica de DNA o RNA de la mostra original convertint-se una eina molt útil per a l'avaluació de l'efecte de determinats contaminants, sempre i quan es conegui prèviament la seva influència sobre l'expressió de determinats gens coneguts.

Aquesta quantificació es realitza mitjançant la lectura de la fluorescència emesa pel component SybrGreen® generada com a resultat de l'amplificació de l'amplicó. Aquests valors de fluorescència emesa són convertits a valors quantitius denominats Cq's (Quantification Cycle). Definim com valor Cq el número de cicle en el qual el valor de la fluorescència supera un valor llindar i és proporcional al logaritme negatiu de la quantitat inicial de cDNA (Gibson, Heid et al. 1996). Podem situar gràficament aquest valor a l'inici de la fase exponencial de la corba d'amplificació (Figura 25).

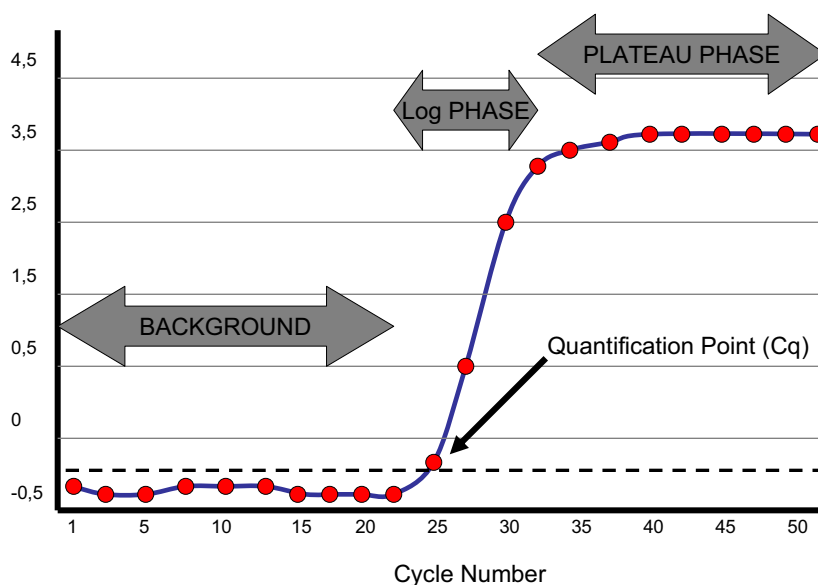


Figura 25 El valor Cq es situa en la zona exponencial de la corba d'amplificació en el llinard on el valor de fluorescència es significativament superior a la fluorescència basal i correspon al màxim de la segona derivada de la respectiva corba d'amplificació.

Com tota reacció de PCR, la síntesi de l'amplicó requereix la utilització d'encebadors específics que han de ser testats mitjançant una corba de calibrat que ens informarà de la seva eficiència d'amplificació. Definim l'eficiència d'una qRT-PCR com la capacitat de la reacció a duplicar el número de còpies de les cadenes de DNA en cada cicle (Bustin & Nolan 2004) i es calcula a partir dels pendents de diverses corbes estàndard de concentracions conegudes segons la següent fórmula (Pfaffl 2004):

$$E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$$

Al introduir l'eficiència, el sistema de quantificació es basa en la següent fórmula:

$$N = N_0(1 + E)^C$$

On N és el nombre de molècules de cDNA, N_0 és el nombre inicial de molècules del DNA motlle, E és l'eficiència i C el nombre de cicles. Com es pot observar, N augmenta de manera exponencial dependent del número de cicles de la PCR.

Per tal de minimitzar les possibles variacions derivades dels processos d'extracció i retrotranscripció, tots els valors Cq dels gens d'estudi han de ser normalitzats amb els valors Cq d'un o diversos gens de referència. Podem considerar com a gen de referència aquells gens que mantenen la seva expressió constant sota les condicions de l'assaig. D'aquesta forma obtenim el valor corregit de Cq respecte el nostre gen de referència:

$$R = \frac{N_0^{\text{Diana}}}{N_0^{\text{Ref}}} = \frac{N_{\text{Diana}} / (1 + E_{\text{Diana}})^{Ct^{\text{Diana}}}}{N_{\text{ref}} / (1 + E_{\text{Ref}})^{Ct^{\text{Ref}}}}$$

On R representa el nombre de còpies normalitzades.

Si es considera que l'eficiència de la reacció és òptima (100%) pels dos gens, diana i referència, s'obté que:

$$R = K \times 2^{(Ct_{\text{Ref}} - Ct_{\text{Diana}})}$$

On K és el coeficient entre el número de còpies N del gen diana i el de referència.

Per calcular la variació de l'expressió del gen diana respecte diferents mostres, es compara l'expressió relativa del nostre gen diana entre les mostres control i les mostres tractades.

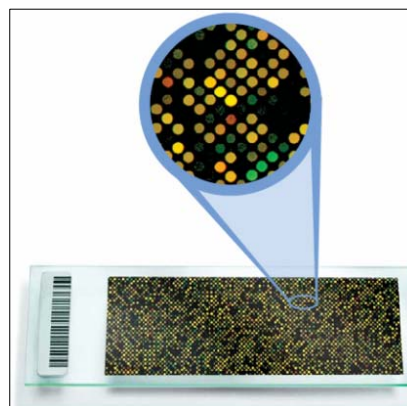
$$\text{Variació de l'expressió} = \frac{R_{\text{tractat}}}{R_{\text{control}}} = 2^{(\Delta Ct_{\text{tractat}} - \Delta Ct_{\text{control}})}$$

Una altra metodologia de càlcul que permet facilitar la interpretació dels resultats és la transformació dels valors en unitats Cq en número de còpies de mRNA per cada 1.000 còpies del gen de referència mitjançant la següent equació:

$$N = 1.000 \cdot 2^{(Ct_{\text{ref.}} - Ct_{\text{diana}})}$$

1.5.3. Hibridació mitjançant chips de DNA (Microarrays):

Els chips de DNA s'utilitzen per analitzar simultàniament l'expressió diferencial d'una col·lecció de gens mitjançant els diferents nivells d'hibridació entre la sonda específica (probe) i la molècula diana (target) indicat mitjançant la fluorescència. La imatge obtinguda analitzada mitjançant estudis bioinformàtics permet conèixer la variació en l'expressió dels gens presents en el



Microarray. Existeixen diversos tipus de microarrays segons les sondes utilitzades. En el present treball s'han utilitzat els microarrays tipus cDNA on en una superfície sòlida de vidre sobre la qual s'hi diposita una col·lecció de punts (Spots) formats per fragments de DNA (Sondes) objecte del nostre estudi. Tot el conjunt forma la Plataforma i ens permet mesurar el grau d'expressió de cada gen (teòricament un per a cada spot) mitjançant la hibridació dels fragments de cDNA complementari de la/es mostra/es a analitzar.

En aquest escrit hem utilitzat la plataforma de Agilent Technologies® (Paso Alto, USA), específica per *Danio rerio* (G2519F) amb format 4x44K. El nostre sistema de marcatge ha estat d'un únic color i els resultats han estat analitzats per Imagens GmbH (Berlin, Germany). L'estudi de les mostres es porta a lloc mitjançant el software MeV4, gràfics Volcano Plot i comparacions amb la base de dades Gene Ontology. Tots els resultats han estat dipositats a la base de dades GEO (Gene Expression Omnibus, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) sota la referència GSE23315.

1.5.3.1. Volcano Plot

El Volcano Plot és un diagrama matemàtic representat en un diagrama cartesià utilitzat per identificar ràpidament canvis en grans llistes de replicats. En ell es representen els valors de significança en l'eix Y vers els valors de Fold Induction en l'eix X (Cui and Churchill 2003). Aquest gràfic estadístic combina valors estadístics com valors-p o ANOVA amb la magnitud del canvi sofert, permetent la identificació individual dels gens d'interès. La representació en base logarítmica dels canvis en l'expressió gènica

permeten plasmar els canvis, tant d'aquells gens que han patit una disminució, com els que han augmentat la seva expressió. Mitjançant aquesta representació podem observar que tots aquells punts que apareixen en el marge dret o esquerra a la part més elevada del gràfic són aquells que han patit un canvi més gran i amb una significació major.

1.5.3.2. Recursos online (Gene Ontology i Zebrafish Information Network)

El projecte Gene Ontology (GO, www.geneontology.com) defineix un vocabulari específic per descriure el gen i els atributs del producte gènic en qualsevol organisme. Es pot dividir en dues parts: l'ontologia, en sentit estricte, defineix, la funció cel·lular, el rol als processos biològics i la localització dins dels components cel·lulars de cada producte gènic, i l'anotació dóna un nom concret i definit a cada gen i permet referir-lo a gens homòlegs i/o anàlegs a altres espècies. Hi ha un gran nombre d'organitzacions, incloent bases de dades d'organismes model i de proteïnes multiespècie, que realitzen taules d'associació entre els suposats productes gènics i GO. *AmiGO!* (<http://amigo.geneontology.org>) és l'eina oficial i gratuïta de recerca i gestió de GO. Mitjançant aquest motor cercador podem buscar un gen o el seu producte, realitzar una recerca creuada amb BLAST dels nucleòtids d'una seqüència, buscar mitjançant la terminologia GO els seus gens corresponents, etc. convertint-se en una eina imprescindible per analitzar tota la informació recopilada en el GO a nivell mundial.

En aquest treball, pels estudis realitzats amb *Danio rerio* s'han utilitzat de manera extensa la Zebrafish Information Network (Zfin, www.zfin.org), base de dades dedicada únicament a aquest animal model i formada principalment per dues parts. La primera és una pàgina web on podem trobar notícies, recursos per a laboratoris, una guia de nomenclatura per als gens de *Danio rerio*, informació anatòmica, etc. La segona consta d'una extensa base de dades amb informació provinent de la literatura científica subministrada pels propis investigadors i que està interconnectada amb altres cercadors i bases de dades, com per exemple el *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Mitjançant les seves aplicacions podem cercar i gestionar informació sobre els gens o els seus productes, buscar anticossos, realitzar alineaments de seqüències (BLAST), cercar línies transgèniques, realitzar mapes gènics, etc. A dia d'avui podem considerar Zfin com la web de referència sobre *Danio rerio* i d'imprescindible consulta si es treballa amb ell com animal sentinella.

1.5.4. Citòmetre de Flux:

La citometria de flux és una tècnica basada en la detecció òptica per contar, examinar i ordenar partícules microscòpiques sospeses en un fluid. Un raig de llum d'una sola longitud d'ona determinada és dirigida al focus hidrodinàmic del corrent del fluid. Un nombre de detectors estan enfocats en el punt on el corrent passa a través del raig de llum; un en línia amb el raig de llum (Forward Scatter o FSC) i diversos perpendiculars (Side Scatter o SSC). Cada partícula suspesa que passa a través del raig dispersa la llum d'una manera concreta, i els compostos químics inherents o adherits a les cèl·lules poden ser excitats de manera que emetin llum a una freqüència més baixa que la de la llum d'origen. La informació obtinguda per la dispersió de fotons és capturada pels detectors i per anàlisis de fluctuacions de la intensitat de llum a cada detector (un per a cada pic de l'espectre d'emissió). El FSC correlaciona el volum amb les cèl·lules i el SSC depèn de la complexitat interna de la partícula (p. ex. forma del nucli, la quantitat i tipus de grànuls citoplasmàtics o la rugositat de la membrana cel·lular). La llista dels paràmetres mesurables és extensa i en constant expansió i inclou la mesura del volum i complexitat morfològica de les cèl·lules, pigments cel·lulars, anàlisi del DNA, estudi d'antígens de superfície cel·lular i intracel·lular, etc.

2.OBJECTIUS

OBJECTIUS

Objectiu General:

L'objectiu d'aquesta tesi és l'optimització de bioassaig basats en biomarcadors d'expressió gènica per la seva aplicació per a l'estudi ambiental de zones que possiblement afectades per diferents compostos.

Objectius específics:

1. Estandardització i aplicació del bioassaig per testar mostres d'origen ambiental per tal d'estudiar el seu impacte en quant a compostos tipus dioxina a les zones de mostreig.

- 1.1 Estudi de l'impacte ambiental per activitat tipus dioxina a l'embassament de Flix i part baixa del riu Ebre.
- 1.2 Desenvolupament i estandardització un bioassaig utilitzant les escames dorsals de *Danio rerio* evitant la mort dels individus estudiats..
- 1.3 Impacte ambiental al tram baix de la Conca del riu Llobregat mitjançant el nou protocol proposat.

2. Estudi dels efectes subletals dels disruptors tiroïdals en els primers estadis del desenvolupament a *Danio rerio*.

- 2.1 Estudi de relació entre el sistema tiroïdal i el metabolisme lipídic.
- 2.2 Disseny d'encebadors específics per la detecció i avaluació de la disrupció tiroïdal
- 2.3 Estudi dels fàrmacs Amiodarona i Metimazol, i el Bisfenol A en el sistema tiroïdal i el correcte desenvolupament de ns de *Danio rerio*.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 La Conca del Riu Llobregat:

El riu Llobregat neix a 1.295m sobre el nivell del mar a Castellar de n'Hug (Berguedà) i desemboca al Mar Mediterrani formant un vast delta de 100 km² al Prat de Llobregat. Els peixos més comuns són tant espècies autòctones com la bagra comuna (*Leuciscus cephalus cephalus*), la truita comuna (*Salmo trutta fario*) com espècies introduïdes com el barb comú (*Barbus graellsii*) o la carpa (*Cyprinus carpio*). Respecte a les aus, les espècies més comunes són el bernat pescaire (*Ardea cinerea*), el corb marí gros (*Phalacrocorax carbo*) o l'ànec collverd (*Anas platyrhynchos*) entre d'altres.

Històricament, el curs del riu ha estat molt aprofitat per la població de la zona per diversos usos agrícoles, industrials o de consum. Durant els segles XIX i XX es van instal·lar a la conca del Llobregat nombroses indústries, destacant-ne les anomenades colònies industrials. Algunes d'aquestes indústries s'han reconvertit en centrals hidroelèctriques. A la segona meitat del segle XX va augmentar la presència industrial i actualment els principals focus de contaminació els trobem als polígons industrials de Terrassa, Rubí o Martorell entre d'altres i a les mines de sal i potasses de Cardona, Súria (tancades en l'actualitat) i Sallent.

Els tres punts de mostreig han estat escollits per l'empresa col·laboradora del projecte Cetaqua (Barcelona, Espanya).

Taula 7. Punts de mostreig de la Conca del Llobregat

	Localització	Lloc N°	Latitud	Longitud
La Mina Pública	Molins de Rei	1	N 41° 24' 42,86"	E 02° 31' 56"
St.Joan Despí	St.Joan Despí	2	N 41° 21' 05,5"	E 02° 02' 48,4"
Aigües de Terrassa	Abdera	3	N 41° 31' 58,0"	E 01° 54' 44,7"

3.1.1.La Mina Pública

Situada al municipi d'Esparraguera rep la contaminació procedent d'aquesta població, d'Abdera, Olesa de Montserrat i del Bruc entre d'altres. A la zona d'Abdera hi ha una gran presència d'indústria tèxtil.



Figura 26. Mina Pública



Figura 27. Mina Pública

3.1.2.Sant Joan Despí:

Situat aigües avall d'Abrera i del primer punt de mostreig, aquest rep els contaminants provinents dels polígons industrials situats a la zona de Martorell. La presa de mostres es realitzà just a l'entrada d'aigua a la purificadora d'aigua de St. Joan Despí.



Figura 28. St. Joan Despí



Figura 29. St. Joan Despí

3.1.3.Molins de Rei - Tub Governador:

Punt situat en el lloc de descàrrega de l'aigua de rebuig de la potabilitzadora de Sant Joan Despí. El Tub del Governador és una canal artificial que rep bona part de les emissions de l'Anoia, la Riera de Rubí i d'altres i les descarrega aigües avall de la potabilitzadora. L'objectiu d'aquesta canalització és doble, per un costat millora les qualitats organolèptiques de l'aigua destinada al consum humà i, en segon lloc, es disminueix l'impacte ambiental mitjançant el retorn de part d'aigua captada al riu, reduint l'efecte sobre el cabdal del riu.



Figura 30. Tub Governador - Molins de Rei



Figura 31. Tub Governador - Molins de Rei

3.2 El riu Roine (Roine-Alps, França)

El Roine és un riu suís i francès que neix en el llac Léman (2180m) als Alps Suïssos i desemboca en el Mediterrani pel Golf de Lleó, on forma un extens delta. Al llarg del seu recorregut travessa ciutats com Ginebra, Lió i Avinyó entre d'altres. Té un cabdal abundant de $1650\text{m}^3/\text{s}$ degut al gran volum d'aigua dels Alps i a la seva canalització.

El punt de mostreig es situa en la població de Ternay, a la regió de Roine-Alps i aigües avall de la població de Lió. Lió és la tercera ciutat més gran de França, amb 466.400 habitants, tot i que la seva àrea metropolitana és la segona després de París, amb 1.648.216 habitants. La seva regió és una de les zones industrialitzades més importants d'Europa, on hi podem trobar indústries químiques, farmacèutiques i agroalimentàries, entre d'altres. L'estudi i anàlisi d'aigua en aquest punt es realitza de forma periòdica des de l'any 2011 mitjançant una estació automatitzada de recollida d'aigua.



Figura 32. El riu Roine a la regió Roine-Alps

3.3 La Conca del riu Ebre

L'Ebre és el riu més cabalós de la Península Ibèrica i l'únic gran riu peninsular que aboca a la Mediterrània. Neix al vessant sud de la Serralada Cantàbrica, té una longitud d'uns 910 km i 83.093 km² de Conca fins a la Mediterrània, on desemboca formant un ample delta de 500 km². Entre d'altres poblacions, l'Ebre passa per Miranda de Ebro, Haro, Logronyo, Calahorra, Saragossa, Casp, Mequinensa, Riba-roja d'Ebre, Flix, Ascó, Xerta, Aldover, Tortosa, Amposta i Deltebre. A part de la contaminació i els abocaments generats per aquestes poblacions i un gran nombre de polígons industrials situats al llarg del seu recorregut, les seves aigües són aprofitades per al regadiu mitjançant canals com l'Imperial, el Tauste i, al tram final, els canals de la Dreta i l'Esquerra de l'Ebre. El seu cabal està regulat pels embassaments de Mequinensa, Riba-roja i Flix que aturen els sediments que haurien d'arribar a la desembocadura, el que produeixen que actualment que el Delta pateixi un fenomen de regressió.

Els punts on s'ha decidit realitzar el mostreig per a l'estudi de la presència de tòxics a la Conca de l'Ebre són:

3.3.1. Embassament de Riba-roja:

El pantà de Riba-roja és un embassament creat per una presa situada al municipi de Riba-roja d'Ebre. El riu Ebre passa encaixonat entre unes plataformes tabulars calcàries de 38 km de llargada i una superfície de 2.152 ha, que arriben fins la confluència amb el Segre, amb una capacitat de 210 milions de m³. Tot i rebre la influència dels polígons industrials de Saragossa i Gállego, les aigües d'aquest l'embassament no presenten cap impacte als animals analitzats amb anterioritat.

3.3.2. Embassament de Flix

Punt situat a l'alçada del municipi de Flix, vila situada al nord de la Ribera d'Ebre. L'embassament, inaugurat el 1948, consta d'una central de 50 MW de potència alimentada per la presa de Flix, d'11 Hm³ de capacitat. Degut als vessaments químics produïts per l'empresa ERCROS (antiga Erquímia) és un pantà amb un alt índex de contaminació. De fet, des de la construcció de la presa de Flix, aquests residus s'han anat sedimentant a la llera dreta del riu, formant un delta artificial clarament visible

format per unes 20.000-36.000 tones de sediments, de les quals 1-10 corresponen a compostos organoclorats i 10-70 a metalls pesants (Grimalt, 2003).

3.3.3. Ascó

Aigües a vall del pantà de Flix es situa el punt de mostreig d'Ascó. Aquesta població, de 1700 habitants, és coneguda per la presència de dues centrals nuclears que aprofiten les aigües del riu Ebre. Al llarg del seu recorregut, l'Ebre travessa diverses poblacions i un gran nombre d'explotacions agrícoles i ramaderes, que en alguns casos, poden afectar la qualitat de la seva aigua.

3.3.4. Xerta

El següent punt es situa a l'altura de Xerta, municipi de la comarca del Baix Ebre, i 12 km riu amunt de la ciutat de Tortosa. En aquest punt, el riu Ebre fa de línia divisòria amb els municipis de Tivenys i Benifallet, a l'est, i ja ha travessat un gran nombre de poblacions, polígons industrials i explotacions agràries. Això fa pensar que les aigües poden presentar fàcilment xenobiòtics que afectin la seva qualitat.

3.3.5. El Delta de l'Ebre

El riu Ebre desemboca al mar Mediterrani al Parc Natural del Delta de l'Ebre, creat l'any 1983, prop de Deltebre i Sant Jaume d'Enveja (Tarragona), formant un gran delta on l'Illa de Buda parteix el corrent en dos braços principals (gola Nord i de Migjorn). És la zona humida més important de Catalunya i la seva superfície total és de 7.736 hectàrees. Climatològicament, el Delta de l'Ebre presenta temperatures moderades i elevada humitat, amb precipitacions escasses i de règim tempestuós. L'estiu és sec, mentre que la primavera i la tardor són les estacions en les quals hi ha una major precipitació. De fet, el fenomen més característic d'aquest territori és el vent, que sol ser persistent i intens. A l'estar situat en l'últim tram del riu Ebre rep tots els contaminants no dipositats que han estat abocats en el seu recorregut. A més, s'hi practica l'agricultura de forma intensa, el que augmenta l'impacte ambiental.

3.4. Manteniment de Zebrafish en estabulari i processos d'exposició

Els peixos adults són mantinguts a l'estabulari amb aigua depurada per osmosi inversa reconstituïda (1,125 g/L Instant Ocean® + 250 µg/L CaSO₄) en grups de 30 individus en peixeres de 40L a temperatura constant (25°C).

3.4.1 Protocol d'exposició en *Danio rerio* per l'Anàlisi d'esctaes

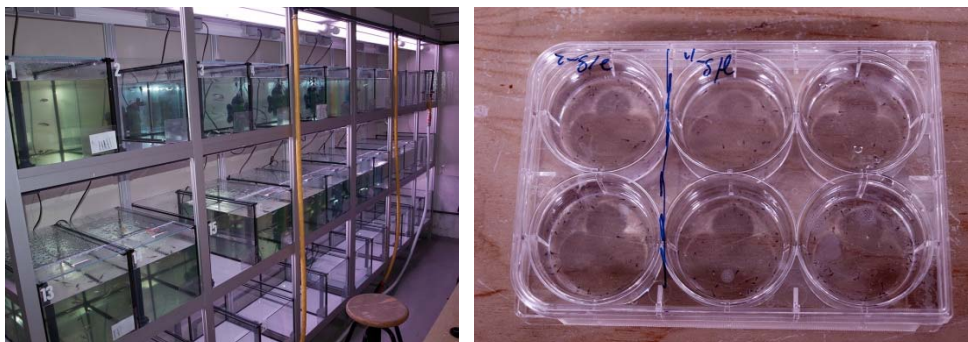
Sis *Danio rerio* adults (edat entre 6 mesos i 2 anys) són introduïts a vasos de Pyrex amb un volum de 5 litres d'aigua reconstituïda i airejada mecànicament per evitar hipòxia. Els peixos són exposats a l'aigua mostrejada o als agents objectes de l'estudi durant 24 hores i, posteriorment, es procedeix a l'extracció de 3 escates dorsals prèvia anestèsia mitjançant Fenoxietanol (1:2000 en aigua reconstituïda). Per evitar la degradació del mRNA les escates són preservades amb RNAlater® de Qiagen (Hilden, Alemanya) i emmagatzemades a una temperatura de -80°C.



3.4.2. Exposició de *Danio rerio* en fase embrionària

Els peixos són induïts a la posta mesclant 3 mascles adults amb 5 femelles en un recipient de 0,5l de plàstic de baixa fondària i proveïda d'una malla de plàstic per separar els adults de la posta. La posta es realitza normalment entre les 0 i les 2 hores d'iniciar-se el cicle diürn del fotoperíode. Les finestres d'exposició varien segons els diversos tractaments; al treball exposat a aquesta tesi començà sempre als 2dpf i s'allarga fins el 5dpf. L'exposició es realitza mitjançant la transferència dels

eleuteroembrions en plaques de Pyrex de 6 pouets (10 ous per pouet) mantenint-los en una incubadora a 27°C i realitzant uns canvis de medi cada 24 hores per evitar possibles falsos negatius deguts a la degradació dels xenobiòtics. Una vegada finalitzada l'exposició, els eleuteroembrions van ser immediatament congelats en nitrogen líquid i conservats a -80°C.



3.4.3 Estudis de toxicitat (ISO 15088)

Es seleccionen 10 ous per a cada dissolució del producte a testar. Tots els ous seleccionats han d'estar fertilitzats i trobar-se a la fase de clivellament, descartant tots els embrions que tenen menys de 4 cèl·lules i més de 128. Mitjançant l'observació amb lupa (Nikon SMZ 1500) s'eliminen tots els ous que presentin anomalies o no es trobin a l'estat de desenvolupament desitjat.

Tal i com indica la normativa ISO 15088, totes les mostres d'aigua han de tenir un pH de 7.0 +/- 0.2 i una concentració d'oxigen superior als 4mg/l. Per la incubació s'utilitzen plaques de 24 poues amb el següent esquema:

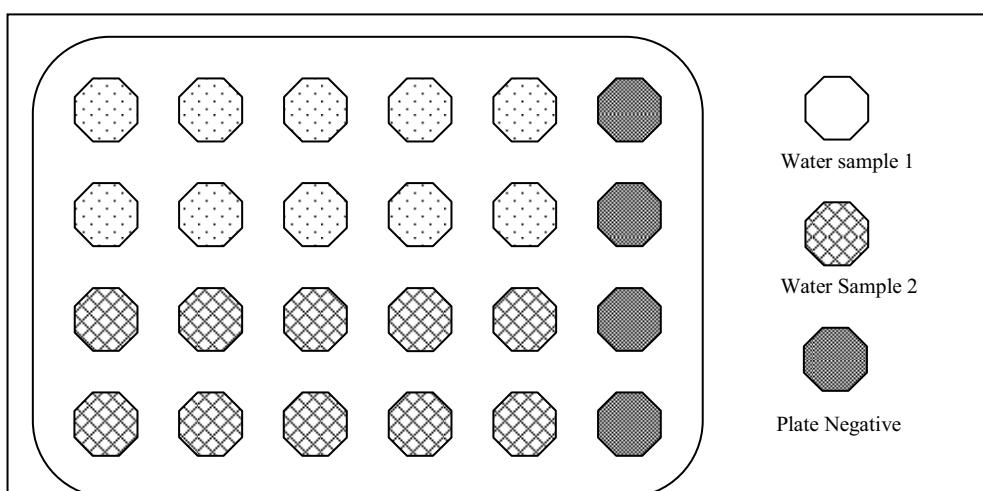


Figura 33. Esquema d'Incubació amb plaques de 24 poues.

Posteriorment les mostres són incubades a 27°C durant 48h. Per tal de validar l'experiment es realitza un control negatiu amb aigua reconstituïda específicament per a l'estudi de toxicitat ISO 15088 (294,0 mg/l CaCl₂·2H₂O + 123.3 mg/l MgSO₄·2H₂O + 63.0 mg/l NaHCO₃ + 5.5 mg/l KCl) i un control positiu afegint 3,7mg/l de 3,4 Dicloralmina. Per poder certificar l'experiment com a mínim ha de sobreviure el 90% dels embrions del control negatiu i la mortalitat del control positiu ha de ser superior al 90%. L'índex de mortalitat es realitza mitjançant l'observació amb lupa (Nikon SMZ 1500) al 50x d'amplificació. Considerem un embrió mort si es compleixen una d'aquestes tres premisses:

- L'ou està coagulat
- El ritme cardíac és indetectable.
- La cua s'ha desenvolupat anòmalament.

3.5. Extracció mRNA pel protocol Trizol® Cloroform.

Les mostres conservades amb RNAlater® de Qiagen (Hilden, Alemanya) són homogeneïtzades amb 1ml de Trizol® de Invitrogen (California, USA) per cada 50-100mg de teixit. Per tal de separar la fase proteica afegim 200 µl de Cloroform per cada ml de Trizol® afegit i, posteriorment, adicionem Isopropanol amb una proporció 1:1 per tal de separar la fase aquosa i precipitar l'àcid nucleid. Les mostres són emmagatzemades en etanol a -80°C per evitar la seva degradació.

Les mostres conservades en etanol són resuspeses en aigua tractada amb 1% de Dietil Pirocarbonat (DEPC Water) per eliminar les RNAses. El DNA genòmic present a la preparació s'elimina per l'acció de la DNAsa DNA-free™ de Ambion® (Califòrnia, USA). L'RNA restant es retrotranscriu amb el kit Transcriptor® de Roche (Rotreuz, Suïssa), usant poli-dT com encebador per maximitzar la retrotranscripció del mRNA.

3.6. Extracció de mRNA pel protocol RNeasy® Kit (Qiagen) + CellAmp™ Whole Transcriptome Amplification Kit (Takara).

La quantitat total de mRNA obtingut utilitzant les escates de *Danio rerio* és insuficient per realitzar l'estudi de l'expressió gènica mitjançant RT-PCR, per tant és necessari augmentar la quantitat de cDNA final mitjançant la utilització del Kit CellAmp™ Whole Transcriptome Amplification Kit de Takara Bio In. (Seta, Japó). Per augmentar la qualitat i quantitat del RNA extret al màxim, el protocol d'extracció Trizol® Cloroform es substituït pel kit RNeasy de Qiagen (Hilden, Alemanya). El kit d'amplificació realitza una retrotranscripció de les cadenes senzilles de RNA amb l'ajuda d'un adaptador dt (RT dt Primer). Posteriorment, el cDNA es pot amplificar mitjançant l'acció de l'enzim TdT que afegeix una cua de poliadenines que podrà ser utilitzada com a lloc de reconeixement d'encebadors oligo-dT en una PCR convencional (Figura 34).

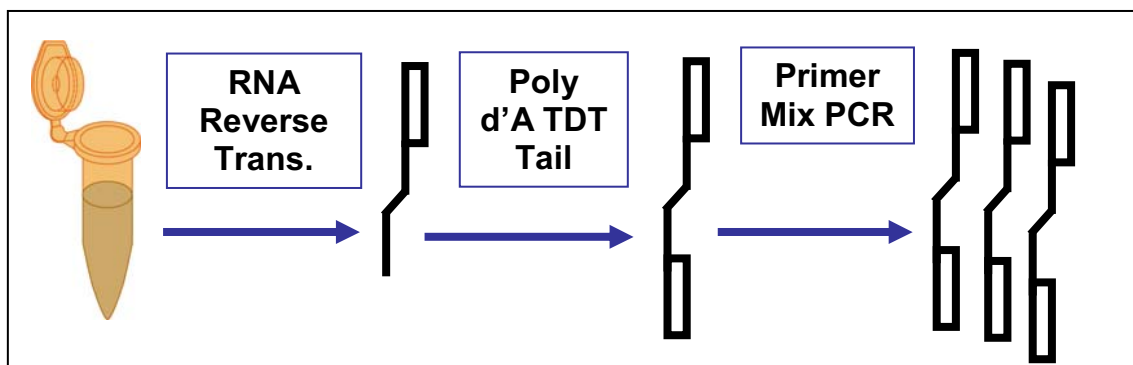


Figura 34. Detall del procés d'amplificació de cDNA

3.7. Gens de referència

L'elecció correcta dels gens de referència és essencial per a una bona representació dels processos biològics que es volen estudiar mitjançant la tècnica de la RT-PCR. Per norma general, solen ser gens que tenen una funció primordial en la supervivència cel·lular i la seva variació en l'expressió només s'altera en condicions molt extremes. En els treballs recollits en aquest escrit utilitzem sempre dos gens de referència.

Gene Name	Accession number	Primer (5'-3')
Ppia2	AY391452	GGGTGGTAATGGAGCTGAGA AATGGACTTGCCACCAGTTC
Efl	X77689	CGTCTGCCACTTCAGGATGTG ACTTGCAGGCGATGTGAGCAG

L'Ef1 (ETS-related transcriptor factor-1) és un dels 31 factors de transcripció de la família dels gens codificats per dominis ETS vitals en la formació de l'embrió, degut al seu paper en l'angiogènesi, la vasculogènesi i l'hematopoesi (Buteau-Lozano, Velasco et al. 2008). El Ppia2 (peptidil prolil cis-trans isomerasa A) pertany a una superfamília de proteïnes presents tant en procarïotes com en eucariotes que permet la isomerització dels enllaços peptídics que impliquen una prolina (Balbach J 2000). En tots els estudis on s'han utilitzat aquests dos gens com a gens de referència no es van trobar diferències significatives d'abundància dels mRNA entre els grups control i els exposats ($p < 0.05$), precisament el que s'espera d'un gen de referència.

3.8. Clonatge i seqüenciació de bandes

La certificació que l'amplicó obtingut amb el procés de qRT-PCR és el correcte es realitza mitjançant la seva seqüenciació. Per tal efecte, l'amplicó obtingut és clonat utilitzant el Kit InsT/Aclone PCR Cloning de Fermentas (Vilnius, Lituània). Aquest es fonamenta en l'ús del vector pTZ57R, dissenyat específicament per al clonatge de fragments (figura 35). El vector pTZ57R/T es subministra linearitzat i amb fragments 3'-ddt a ambdós extrems. Aquests extrems permeten únicament la inserció d'amplicons amb cues poli-A afegides per les polimersases termoestables durant la PCR, possibilitant la recirculació del plasmidi. Aquest producte circular es pot utilitzar directament per transformar cèl·lules d'*E.coli* competents, el que permet augmentar l'eficiència del clonatge.

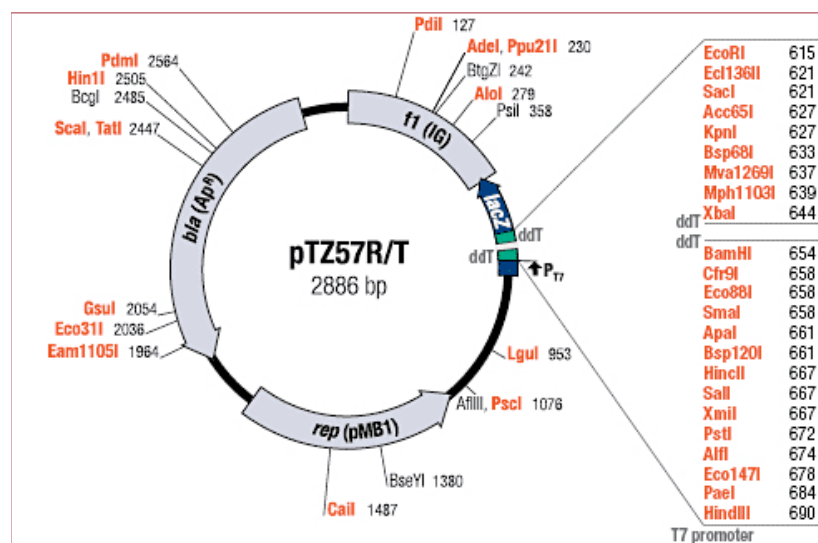


Figura 35. Mapa de restricció del vector pTZ57R/T (Fermentas, Lituània).

4. FACTORS D'IMPACTE

FACTOR D'IMPACTE DELS ARTICLES PUBLICATS

Benjamí Piña Capó, director de la Tesis Doctoral presentada per Sergi Pelayo Martínez , exposa que el doctorand ha participat activament en la realització de tots els articles presentats a la memòria. En general, ha participat a la discussió i al disseny experimental així com ha contribuït de manera significativa a l'anàlisi de les mostres i en l'elaboració i correcció dels treballs.

A continuació es detallen els articles que formen part d'aquestes tesis, el grau de participació de la doctoranda i el Factor d'Impacte (F.I.) de les revistes a les quals s'han publicat.

1. **Pelayo S**, López-Roldán R, González S, Casado M, Raldúa D, Cortina JL, Piña B. (2010). *A zebrafish scale assay to monitor dioxin-like activity in surface water samples*. Anal Bioanal Chem. 2011 Oct;401(6):1861-9.

F.I.: 3.841

Grau de participació: Recollida de mostres, disseny i validació d'un nou protocol experimental, realització de l'extracció i anàlisi de les mostres mitjançant qRT-PCR.

2. **Pelayo S**, Oliveira E, Thienpont B, Babin PJ, Raldúa D, André M, Piña B. (2011). *Triiodothyronine-induced changes in the zebrafish transcriptome during the eleutheroembryonic stage: implications for bisphenol A developmental toxicity*. Aquat Toxicol. 2012 Apr;110-111:114-22.

F.I.: 4.225

Grau de participació: Disseny experimental, realització de l'extracció i anàlisi de les mostres mitjançant qRT-PCR i microarray.

3. Olivares, A., Quirós, L., **Pelayo, S.**, Navarro, A., Bosch, C., Grimalt, J.O., Fabregat, M.C., Faria, M., Benejam, L., Benito, J., Solé, M., Barata, C., Piña, B. (2010) *Integrated biological and chemical analysis of organochlorine compound pollution and of its biological effects in a riverine system downstream the discharge point*. Sci. Tot. Env., 408(22):5592-9.

F.I.: 2.905

Grau de participació: Realització de l'extracció i anàlisi de les mostres provinents de l'embassament de Flix mitjançant qRT-pCR

Barcelona, 1 Setembre de 2012

Dr. Benjamí Piña Capó
Director de la tesi doctoral

5.RESULTATS

RESULTATS

Els resultats d'aquesta tesi es presenten com a un compendi de publicacions dividits en 2 capítols. A més, s'ha decidit incloure dades, anàlisis i resultats no presents en aquestes publicacions, però d'imprescindible descripció per a la correcta comprensió del compendi de treballs presentats.

5.1 Capítol 1: Estandardització i aplicació del bioassaig per testar mostres d'origen ambiental per tal d'estudiar el seu impacte en quant a compostos tipus dioxina a les zones de mostreig.

Article 1. Pelayo S, López-Roldán R, González S, Casado M, Raldúa D, Cortina JL, Piña B. (2010). *A zebrafish scale assay to monitor dioxin-like activity in surface water samples*. Anal Bioanal Chem. 2011 Oct;401(6):1861-9.

Article 2. Olivares, A., Quirós, L., Pelayo, S., Navarro, A., Bosch, C., Grimalt, J.O., Fabregat, M.C., Faria, M., Benejam, L., Benito, J., Solé, M., Barata, C., Piña, B. (2010) *Integrated biological and chemical analysis of organochlorine compound pollution and of its biological effects in a riverine system downstream the discharge point*. Sci. Tot. Env., 408(22):5592-9.

5.2 Capítol 2: Estudi dels efectes subletals dels disruptors tiroïdals en els primers estadis del desenvolupament a *Danio rerio*.

Article 3. Pelayo S, Oliveira E, Thienpont B, Babin PJ, Raldúa D, André M, Piña B. (2011). *Triiodothyronine-induced changes in the zebrafish transcriptome during the eleutheroembryonic stage: implications for bisphenol A developmental toxicity*. Aquat Toxicol. 2012 Apr;110-111:114-22.

5.1 CAPÍTOL 1: Estandardització i aplicació del bioassaig per testar mostres d'origen ambiental per tal d'estudiar el seu impacte en quant a compostos tipus dioxina a les zones de mostreig.

Article 1. Assaig en escames de peix zebra per a la monitorització de l'activitat dioxina en aigües superficials.

Sergi Pelayo¹, Ramon López-Roldán², Susana González², Marta Casado¹, Demetrio Raldúa¹, Jose Luis Cortina^{2,3} and Benjamin Piña¹

(1)Departament de química Ambiental, IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain ; (2)CETAqua, Carretera d'Esplugues, 75, Cornellà, 08940 Barcelona, Spain; (3)Departament d'Enginyeria Química Chemical Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain

Les noves regulacions sobre la qualitat de l'aigua requereixen un control dels possibles efectes biològics inesperats que comporten l'aparició de nous contaminants. En aquest escrit presentem un protocol basat en l'exposició directa de Peix zebra a les mostres d'aigua i l'anàlisi de l'expressió de gens específics presents en les seves escames per determinar la presència de compostos amb activitat dioxina. La metodologia presentada no requereix la mort de l'animal i permet la detecció de l'activitat biològica després d'un únic dia d'exposició. El nostre mètode, testat amb mostres reals del riu Llobregat, va permetre l'observació d'una clara variació espacial i temporal de la qualitat de l'aigua, demostrant la seva idoneïtat per a la monitorització de l'estat de l'aigua lligat a abocaments específics. Les altes activitats biològiques no s'han relacionat amb els actuals paràmetres de qualitat d'aigua (Macrocontaminants, terbolesa, TOC, etc.) però correlacionen amb la presència de microcontaminants (estrògens, detergents, etc..) relacionats amb l'activitat domèstica e industrial. Per tant, l'assaig basat en escames proporciona una nova eina per avaluar els canvis en la qualitat de l'aigua que difícilment poden ser-ho mitjançant altres processos estàndards existents fins ara. Aquest mètode figura entre uns pocs protocols descrits que permeten detectar els efectes biològics amb mostres d'aigua sense necessitat de pre-concentrar-les i amb un temps d'exposició de 24 hores.

Paraules Clau: Contaminants tipus dioxina – PCR en temps real – *Danio rerio* – Bioassaig – Quantificació de RNA – *cyp1a* – GC-MS

Article 1. A zebrafish scale assay to monitor dioxin-like activity in surface water samples

Sergi Pelayo¹, Ramón López-Roldán², Susana González², Marta Casado¹, Demetrio Raldúa¹, Jose Luis Cortina^{2,3} and Benjamin Piña¹

(1)Department of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain ; (2)CETaqua, Water Technology Center, Carretera d'Esplugues, 75, Cornellà, 08940 Barcelona, Spain; (3)Department of Chemical Engineering, Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain

New regulations on water quality require a close control of the possible biological activities known or unexpected pollutants may bring about. We present here a protocol based on the direct exposure of zebrafish to river water and the analysis of expression of specific genes in their scales to determine the presence of compounds with dioxin-like biological activity. The method does not require the killing of animals and allows detection of the biological activity after a single day of exposure. When tested, the method with real samples from the Llobregat River, clear temporal and spatial variations were observed, demonstrating its suitability for monitoring natural variations in water quality linked to specific discharges. High biological activities were unrelated to the currently checked water quality parameters (macropollutants, turbidity, TOC, etc.), but they did correlate with the presence of micropollutants (estrogens, detergents, etc.) related to domestic and/or industrial runoffs. The scale assay therefore provides a new tool to evaluate water quality changes that cannot be easily derived from the existing standard analytical procedures. It ranks among the very few described protocols able to detect biological effects from natural water samples, without a pre-concentration step, and after only 24 h of exposure.

© Springer-Verlag 2011

Article History: Received: 25 May 2011, Revised: 12 July 2011, Accepted: 26 July 2011 Published online: 6 August 2011

Keywords Dioxine-like pollutants – Real-time PCR – *Danio rerio* – Bioassays – RNA quantification – *cyp1a* – GC-MS

Introduction

Water quality regulations are becoming more stringent both at national and international levels. In the European context, both the Environmental Liability Directive (2004/35/EU) and the Water Framework Directive (2000/60/EU) (WFD) respond to new paradigms, based on proactive approaches, rather than to legal restrictions, as the latter are hardly able to cope with the directives of international environmental agreements [1].

The WFD, which is periodically updated (recently by 2008/105/EU), requires a good ecological status of all the water bodies. It requires monitoring the discharges in rivers and other water bodies of priority and emerging micropollutants, in order to assess their impact on aquatic ecosystems. Its last version defines a Priority Substances Directive in which Environmental Quality Standards are defined for a list of 33 pollutants, although a more comprehensive list is currently under consideration. However, even large-scale analyses for these 33 pollutants to determine whether or not their concentrations are below the respective EQ would not necessarily be representative of the water status. Moreover, spot sampling campaigns, the most common approach for analyzing these compounds, are costly and labor-intensive and not sufficient to have an accurate picture of the chemical and biological status of water quality [2–4].

For all of these reasons, new tools should be established to obtain all the information needed. Bioassays constitute a fundamental component of any decision-making process concerning the evaluation of water quality. We present here a bioassay devoted to detect changes or fluctuations in chemical concentration of specific pollutants in surface waters, as those resulted from example for accidental spills. This bioassay relies on the known ability of fish scales to rapidly respond to chemical pollution by rising the expression levels of CYP1A mRNA, and on existent methodologies to analyze this increase at relatively low costs in terms of time, labor, and money [5].

Cytochrome P450 1A (CYP1A) is an established biomarker of exposure to toxicants in many animal species, including fish [6–8]. CYP1A expression increases as a response to the presence in the blood of ligands of the aryl hydrocarbon receptor (AhR), which

include a variety of pollutants, such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo(p)dioxin and benzo[a]pyrene (B[a]Py). The presence of these substances, globally known as dioxin-like pollutants, has been related to different deleterious effects, including immune dysfunction, endocrine disruption, reproductive toxicity, developmental defects, and cancer in vertebrates [9–11].

Changes on CYP1A activity have been usually evaluated by measuring one of its associated enzymatic activities, such as the ethoxyresorufin O-deethylase activity (EROD; [12, 13]), although analysis of CYP1A gene expression by mRNA-quantification methods are recently becoming suitable alternatives [7, 14, 15]. These methods are specially useful for in-field studies due to possibility to stabilize mRNA with appropriate agents and the small amount of sample required for the analysis [16, 17]. Whereas both EROD assays and most mRNA-based methods usually implicate dissection of internal organs (liver, kidney, ovary, etc.) or a significant damage of the specimen (biopsy, gill removal, etc.), monitoring toxicant exposure in fish scales is a non-destructive method that has many applications in environmental monitoring and food safety control [5]. Fish scales are metabolically active, containing different bone cells similar to bone osteoclasts and osteoblasts in tetrapods. These cells respond to a variety of physiological and external effectors, including calcitonin, melatonin, estrogens, and heavy metals [18–21]. We present here a modification of the published non-lethal bioassay based on goldfish (*Carassus auratus*) scales [5], specifically designed to monitor freshwater quality. We used the zebrafish *Danio rerio* to reduce up to 90% the required volume of water samples and the aquarium space and demonstrated that the method is able to detect natural changes in water quality in a direct exposure scheme, without pre-concentration of the organic compounds present in the water.

Materials and methods

Sampling sites and sampling procedure

Llobregat River is located in north east of Spain, with a 160-km-long course and discharging into the Mediterranean Sea, 10 km south of Barcelona. The Mediterranean

climate, predominant in the Llobregat basin, is characterized by variable flows that can range from low m³/s to several hundred m³/s in storming periods, normally in spring and fall. Despite this relative low flow values and its unpredictability, the Llobregat basin constitutes the most important drinking water source for Barcelona and its surrounding area. Not surprisingly, the whole basin is overexploited and polluted by the effluents from more than 30 urban wastewater treatment plants (WWTP), industries, and agriculture runoffs, particularly at the lower course. To enhance the water quality, several bypass channels have been constructed along the river in order to avoid the arrival of the most contaminated fractions to drinking water treatment plants (DWTP), including effluents from tannery, food products, textile, pulp and paper industries, among others, as well as agricultural runoffs (see Fig. 1). These bypass channels are discharged again into the Llobregat River after the catchment for the DWTPs increasing the river flow but worsening water quality at the last section of the river.

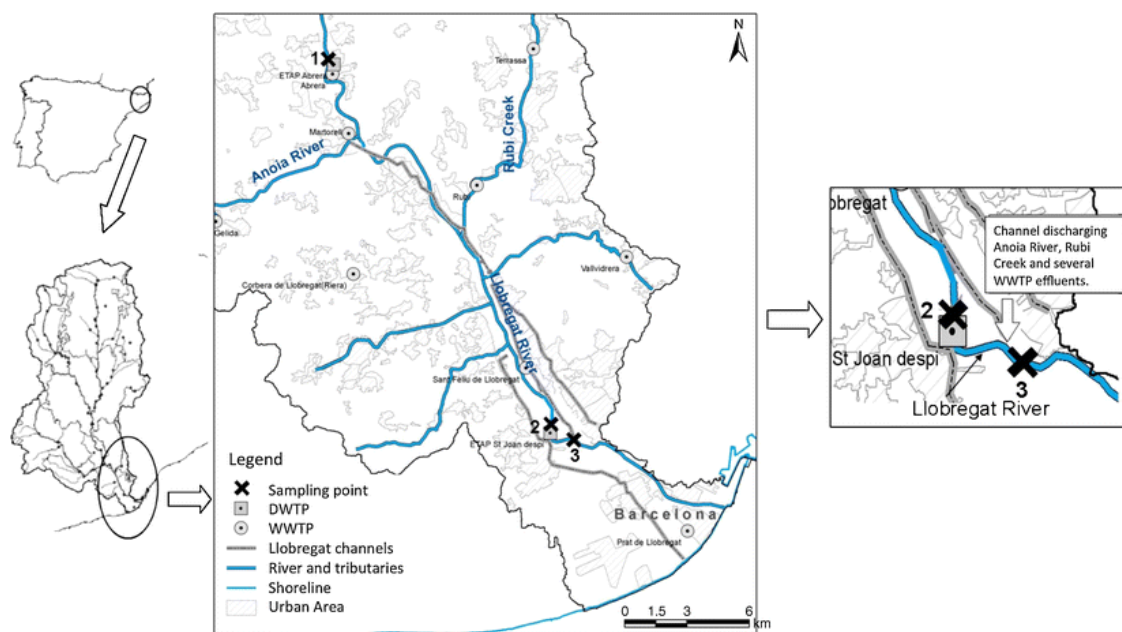


Fig. 1 Map of the sampling area at the Llobregat River basin (NE Spain). Geographical locations of sampling points, wastewater treatment plants (WWTP), drinking water treatment plant (DWTP), and the path of Llobregat River, its tributaries and bypass channels are indicated

Twenty-four surface water samples were collected at three different sites in the river basin (depicted in Fig. 1): site 1 is a DWTP intake point located downstream of the town of Esparraguera (22,000 inhabitants), receiving the effluent WWTP of this municipality, and from other towns as Abrera (11,500 inhabitants), Olesa de Montserrat (23,600 inhabitants), Collbató (4,200 inhabitants), and El Bruc (2,000 inhabitants),

among others. This point has the impact of textile, chemical surface treatment, and other industries. Site 2 is also a DWTP intake point located at approximately 30 km from site 1, in the lower part of the river, and its water quality is influenced by different discharges and tributaries as well as by the impact of drainage system overflows. Site 3 lies just downstream to site 2, after the confluence of the bypass channels to the main river course.

Samples were collected in two campaigns, one in spring (7th–18th June 2010) and a second in the fall (21st October to 4th November 2010). In both cases, site 2 was sampled, along with a second site, site 1 in spring and site 3 in the fall. Surface water samples were collected in amber glass bottles and transported to the laboratory, where they were kept refrigerated (4 °C) until their use.

Water quality analysis

Quality parameters and pollutants were analyzed in all the water samples. Physicochemical parameters determined, their method of analysis, limit of detection (LOD), and range of concentrations found are listed in Table 1. These parameters were only determined at site 2 for both sampling campaigns.

Table 1 Physicochemical parameters determined at site 2 (both sampling campaigns)

Parameter	Method of analysis	LOD	Min–max (mean)
Flow (m ³ /s)	Flowmeter		4.2–111.8 (25.7) ^a
pH	Electrometry		7.6–8.8 (8.1)
Temperature (°C)	Thermometry		17–26 (20.5)
Turbidity (NTU)	Turbidimetry	0.2	26–1800 (269)
UV absorption 245 nm/100 cm	Spectroscopy		7.9–22.5 (13)
Conductivity (µS/cm)	Potentiometry	0.3	590–2,719 (1,390)
Total alkalinity (mg CaCO ₃ /L)	Automatic acid–base titration		146–404 (246)
NH ₄ ⁺ (mg NH ₄ ⁺ /L)	Ion chromatography	0.05	<0.05–34 (0.5)
Total organic carbon (mg/L)	IR spectroscopy	0.2	3.2–9.9 (4.1)
Dissolved oxygen (mg O ₂ /L)	Oximetry		6.1–8.9 (10.0)
NO ₂ ⁻ (mg NO ₂ ⁻ /L)	Ion chromatography	0.04	0.1–0.7 (0.4)

^aData obtained from Agència Catalana de l'Aigua <http://www.gencat.cat/aca/>

A total of 24 pollutants, belonging to the classes of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), alkylphenols, plasticizers, and estrogens were measured in water samples by gas chromatography–mass spectrometry. The analytical method is certified by the Spanish Accreditation Body (ENAC: <http://www.enac.es/web/english/home>) with accreditation number 109/LE285. The LODs were 10 ng/L for all PAHs analyzed, 20 ng/L for PCBs, 100 ng/L for alkylphenols, 20 ng/L for the plasticizer, and 50 ng/L for the estrogens. Table 2 lists compounds analyzed in this work.

Table 2 LOD values and maximal (MAX), average (AVG), and frequency (FREQ) values for different pollutants in Llobregat water samples.

Compound	LOD(µg/L)	Site 1(sampling campaign 1, n=6)			Site 2 (sampling campaigns 1 & 2, n=12)			Site 3 (sampling campaign 2, n=6)			Total FREQ (%)
		MAX (µg/L)	AVG (µg/L)	FREQ (%)	MAX (µg/L)	AVG (µg/L)	FREQ (%)	MAX (µg/L)	AVG (µg/L)	FREQ (%)	
Alkylphenols											
Nonylphenol diethoxilate	0.1	b.d.l.	b.d.l.	0	0.31	0.57	25	1.6	0.74	50	25
Nonylphenol monoethoxilate	0.1	b.d.l.	b.d.l.	0	0.26	0.21	17	2.7	0.97	50	21
Nonylphenol (CAS 104-40-5)	0.1	0.44	0.25	50	1.2	0.38	50	6.2	1.67	83	58
4-Tert-octylphenol	0.1	b.d.l.	b.d.l.	0	b.d.l.	b.d.l.	0	0.15	0.13	33	8
Plasticizer											
Bisphenol A	0.02	0.1	0.06	50	0.13	0.076	42	0.04	0.035	33	42
Estrogens											
β-Estradiol	0.05	0.13	0.11	33	0.12	0.1	25	b.d.l.	b.d.l.	0	21
Estriol	0.05	b.d.l.	b.d.l.	0	b.d.l.	b.d.l.	0	0.17	0.13	50	13

b.d.l. below detection limit

Biological assay

Exposure protocol

Ten 1-year-old *D. rerio* males were exposed to water samples in 5,000 mL open, mechanically aired PYREX containers for 24 h at 25 °C. Two subsets of fish were exposed to Aquarium water (1.125 g/L Instant Ocean® + 250 µg/L CaSO₄) containing either 1 µM of β-naphthoflavone (using dimethyl sulfoxide (DMSO) as vehicle), or only DMSO, as positive and negative controls, respectively. Mortality during the exposure protocol was anecdotal.

Scale collection

Fish were treated with anesthetic Fenoxiethanol (1:2,000 in Aquarium water) to minimize fish stress. Fenoxiethanol action is completely reversible. Three scales were removed from the front-dorsal area, as this number was considered as the maximal not inducing relevant fish lethality. After scale extraction, fish recovered in 1 to 2 weeks, although their suitability for reuse has not been formally evaluated yet.

RNA extraction and whole transcriptome amplification

Removed scales were preserved in RNAlater® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to prevent RNA damage. Total RNA was extracted using the Qiagen RNeasy® Micro Kit. Quality and quantity of resulting RNA were measured by both micro-UV spectrophotometry (Nanodrop) and microfluidic electrophoresis (Bioanalyzer, Agilent Technologies). In the next step, we used a cDNA amplification protocol using the Takara CellAmp whole transcriptome amplification (WTA) Kit® and Takara Ex Taq Hot Start Version®. This protocol is designed to perform cDNA amplification directly from small amounts of cell and also from small amount of RNA. Amplified cDNA was diluted according to expected amounts of target genes and used as template in real-time PCR experiments. The WTA protocol amplifies cDNA by approximately 1,000-fold,

and we tested that it did not change significantly the relative proportion of specific cDNA molecules in zebrafish scale samples (to be published elsewhere).

Quantitative real-time PCR

Primers for *ef1α* (reference gene, GeneBank accession number X77689) and *cyp1a* (*D. rerio* CYP1A gene, dioxin-like response, GeneBank accession number AB078927) for cyprinids have been published elsewhere [5, 22]. Amplification of all sequences was tested by conventional and qRT-PCR (Lightcycler, Roche). Relative mRNA abundances of different genes were calculated from the second derivative maximum of their respective amplification curves (C_p ; calculated by triplicates). To minimize errors on RNA quantification among different samples, C_p values for the target genes (C_{ptg}) were normalized to the average C_p values of the reference gene to obtain the corrected C_p values ($corr\ C_p = C_{ptg} - C_{pref}$). To facilitate the interpretation of graphs, $corr\ C_p$ values were transformed into mRNA copies per 1,000 copies of *ef1α* mRNA (% of reference gene) according to the equation $1,000 \times 2^{-corrCp}$ [23].

Data treatment and statistical analyses

Datasets were checked for outliers calculating the corresponding Z-scores; data points (individual C_p values) with Z-scores of >2 were removed from the final datasets (11 samples from a total of 265 (4.2%)). Correlations between different parameters were analyzed with the SPSS 19 package (SPSS Inc., Chicago, IL). Non-parametric Spearman's correlation was chosen to correlate disparate sets of data (physicochemical data, concentrations, and gene expression values). Statistical treatment of gene expression between pairs of values (treated vs. control) was done by the Student's t test; analyses of values from different populations (sampled sites) were performed using one-way ANOVA, after assessment of normality of data by the Kolmogorov–Smirnov test.

Results and discussion

Analysis of *cyp1a* expression in zebrafish scales

Exposure to 1 μ M of β -naphthoflavone for 24 h increased *cyp1a* mRNA levels in zebrafish scales by about 100-fold (Fig. 2, left panel, mean the logarithmic scale). This value is similar to the value observed for goldfish, and demonstrates the feasibility of the method [5]. DNA sequence of the amplified fragment was identical to the known *cyp1a* gene sequence from *D. rerio* (data not shown). Three independent experiments of *cyp1a* induction in zebrafish scales by β -naphthoflavone were performed using different fish pools and reagent batches within a period of about 6 months. A fourth similar experiment was analyzed without WTA amplification, by extracting a large number of scales and correcting the amount of input RNA according to the expected amplification of WTA-treated samples. Table 3 shows the statistical parameters of the results from these experiments. Cp values from reference gene *elf1 α* showed a moderate variability among experiments, with a coefficient of variation slightly above 10% for the 62 samples, but no significant changes between treated and non-treated samples, neither in WTA-amplified samples nor in non-amplified ones. Variations in *cyp1a* Cp values from replicate samples (either control or treated) were slightly higher than those from the reference genes, although a substantial part of this variability was eliminated in corr Cp values (Table 3, compare standard deviation values for Cp and corr Cp values). Fold inductions upon β -naphthoflavone exposure ranged from 86- to 220-fold (average of 140-fold, calculated from corr Cp values), with no significant differences between WTA-amplified and non-amplified samples (136- vs. 164-fold). These data indicate that results from different series, analyzed 6 months apart, can be compared and that WTA amplification did not alter significantly relative expression or fold induction levels.

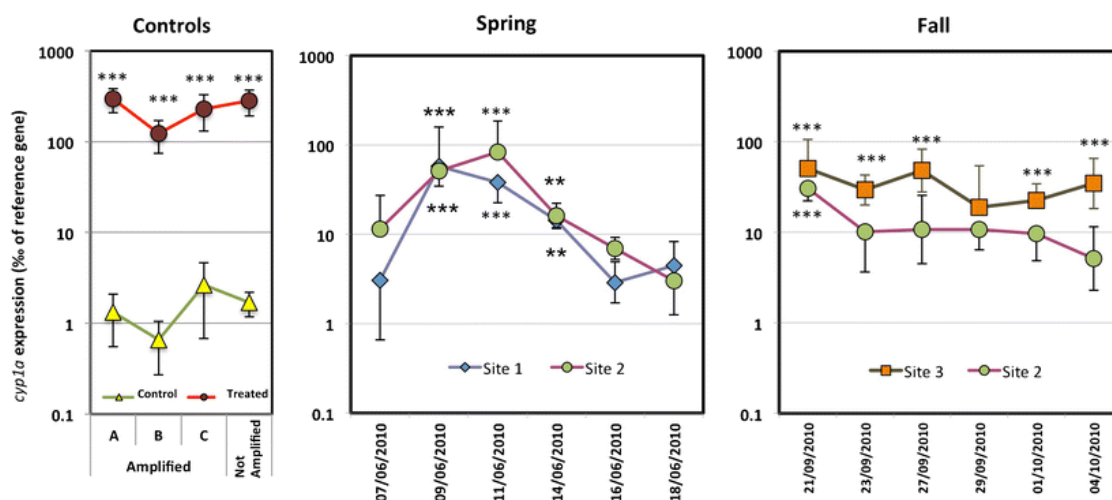


Fig. 2 Relative *cyp1a* expression values (expressed as % of reference gene) in zebrafish scale. The right panel (Controls) shows control (yellow triangles, green line) and naphthoflavone-treated (purple circles, red line, 1 μ M, 24 h) zebrafish for four independent experiments, totaling 62 individual data. Note that one experiment was performed without WTA amplification (rightmost datapoint). Central and right panels, results from fish exposed to water samples from site 1 (blue diamonds), site 2 (green circles), or site 3 (orange squares), from both Spring (center) and Fall (right) campaigns. Note that samples from site 2 were collected at both campaigns. Whiskers indicate SD values; asterisks indicate significant differences from negative controls (Student's t test: * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001)

Table 3 Statistical parameters for qRT-PCR results from WTA-amplified and non-amplified samples

Sample subset	Gene	Parameter	All			Amplified samples			Non-amplified samples			T test (treated vs. control)		
			Average	SD	<i>n</i>	Average	SD	<i>n</i>	Average	SD	<i>N</i>	Amplified	Non-amplified	
All	<i>elf1a</i>	Cp	14.56	1.61	62	14.70	1.71	52	13.81	0.36	10			
Control	<i>elf1a</i>	Cp	14.32	1.56	28	14.42	1.69	23	13.85	0.43	5			
		<i>cyp1a</i>	Cp	23.66	1.89	28	23.79	2.06	23	23.06	0.50	5		
		Corr Cp	9.34	1.54	28	9.37	1.69	23	9.21	0.52	5			
Treated	<i>elf1a</i>	Cp	14.75	1.64	34	14.92	1.72	29	13.77	0.34	5	>0.05	>0.05	
		<i>cyp1a</i>	Cp	16.97	1.55	34	17.20	1.53	29	15.60	0.71	5	6.0×10^{-18}	5.6×10^{-8}
		Corr Cp	2.21	0.82	34	2.28	0.85	29	1.83	0.55	5	3.2×10^{-25}	2.1×10^{-8}	

Fish exposed to different Llobregat water samples for 24 h showed variations of *cyp1a* mRNA by more than one order of magnitude (Fig. 2, central and right panels). These variations were more pronounced in spring samples (campaign 1), with dramatic changes in dioxin-like activity among samples taken 2 to 3 days apart. Note that the activity of samples from sites 1 and 2 followed a very similar pattern, with a sharp increase between 7 June and 9 June and a gradual decrease from 14 June on (Fig. 2). Fall samples (campaign 2) from site 2 showed a comparatively uniform dioxin-like activity level, with a possible small peak on 21 September 2010. Samples from site 3 showed activity two to four times higher than in site 2 (Fig. 2), suggesting a higher level of pollutants in that site ($p=0.005$, paired Student's t test). This is consistent with the

bypass strategy designed for this section of the river, as site 3 collects runoffs and polluted discharges that are diverted from site 2.

The results showed a clear response of zebrafish scales to putative AhR ligands present in some Llobregat water samples, and that this biological activity varied very significantly in relatively short times (1 or 2 days). Elevated CYP1A expression levels have been observed in fish natural populations from different contaminated sites in the Ebro River (North East Spain), related to the presence of organic pollutants [24–26]. These are strong reasons for implementing biological analyses that can monitor these activities in (at least) daily basis. There are different bioassays for the detection of AhR ligands in water samples, based either in modified mammalian cell lines [27, 28], genetically engineered yeast strains [29, 30], or in immunodetection of specific compounds [31]. However, to our knowledge, the fish scales assay is the only one able to detect dioxin-like activity in water samples without pre-concentration or cleaning steps, and after only 24 h of exposure.

Water quality analysis

Llobregat River typically shows a low flux rates (25 m³/s on average), accompanied with high salinity (above the mS/cm mark on average) and high turbidity (tens to thousands of NTU) values (see Table 1 and Fig. 3). During the spring sampling, a sporadic sudden flux increase (4-fold increase in 2 days) was observed, accompanied by an increase on turbidity (likely from increased erosion) and a decrease of conductivity and other related parameters (sulfate and chloride anion contents; Fig. 3 and Table 4). The rest of analyzed parameters were unrelated to the river flux, with few clear correlations between them. For example, temperature appeared as the main factor determining levels of dissolved O₂ (inverse correlation; Table 4).

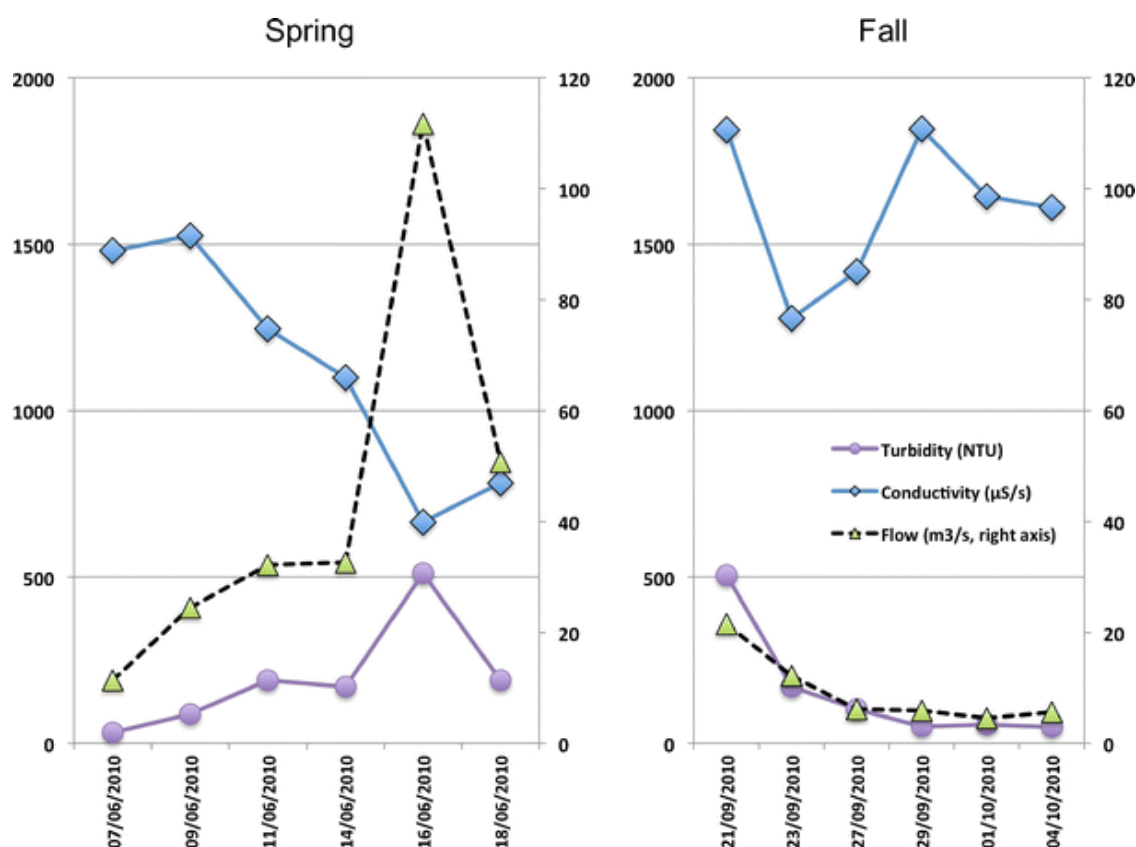


Fig. 3 Temporal profiles of turbidity (in NTU), conductivity (in µS/cm) and river flow (in m3/s) values corresponding to site 2 during the Spring and Fall sampling campaigns. Units for each parameter are shown in Table 1. Note that flow values are referred to the right axis.

Table 4 Spearman's rho correlation between physicochemical and biological parameters from site 2 water samples

Parameters	Flow	Turbidity	Conductivity	Cl ⁻	SO ₄	NH ₄ ⁺	pH	Temp.	Dissolved O ₂	TOC	NO ₂ ⁻	Sum Micropoll.	<i>cyp1a</i> Express.
Flow	1	0.772**	-0.874**	-0.699*	-0.441	0.679*	0.343	-0.399	0.091	-0.014	-0.191	0.068	0.133
Turbidity		1	-0.786**	-0.491	-0.733**	0.677*	-0.061	-0.541	0.018	0.16	-0.339	0.166	0.053
Conductivity			1	0.874**	0.594*	-0.446	-0.357	0.564	-0.21	0.301	0.296	0.061	0.105
Cl ⁻				1	0.427	-0.15	-0.507	0.592*	-0.355	0.492	0.251	0.374	0.336
SO ₄					1	-0.096	-0.204	0.669*	-0.369	0.246	0.756**	0.356	0.524
NH ₄ ⁺						1	-0.233	0.144	-0.525	0.571	0.180	0.576	0.510
pH							1	-0.456	0.792**	-0.663**	-0.584	-0.471	-0.447
Temp.								1	-0.795**	0.301	0.571	0.437	0.445
Dissolved O ₂									1	-0.578	-0.708*	-0.445	-0.487
TOC										1	0.274	0.592	0.542
NO ₂ ⁻											1	0.242	0.651*
Sum micropoll.												1	0.712**
<i>cyp1a</i> expres.													1

TOC total organic carbon; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Microcontaminants (mainly estrogenic compounds) were found in 75% (18 out of 24) of samples analyzed. Nonylphenol (NP) and bisphenol A were the two compounds found with higher frequency (58% and 42%, respectively; Table 2), whereas octylphenol (OP) and estriol were found in only 8% and 13% of the samples,

respectively. PCBs and PAHs were not detected in any of the samples analyzed. The maximum concentrations were found for NP in the three sampling sites. The concentrations found were in good agreement with the ones published previously [32, 33]. As expected, site 3 was the most polluted one, as it integrates the most contaminated fractions of the Llobregat River. Pollutant concentrations were consistently higher in site 2 than in site 1, as the contamination load increased downstream along the river due to the discharges of industries and domestic WWTPs. In any case, it should be stressed that these concentrations were comparatively low: only 10% of the measurements exceeded their corresponding LOD values by more than 3-fold, and only five (out of 184 measurements) were more than 10-fold higher than the corresponding LODs.

From all parameters analyzed, only nitrite content and the aggregated concentration of micropollutants correlated with the biological response observed in fish scales (Table 4 and Fig. 4). These micropollutants were selected by their putative or proven estrogenic activity [30, 33]. Estrogens and AhR ligands are structurally different in most cases, although some compounds show both activities at relevant concentrations [30], and some cross-talk between both regulatory pathways has been described in fish and other systems, particularly linked to the presence of nonylphenol [34, 35]. However, we think that the most likely explanation for the observed correlations is that the presence of nitrites and micropollutants shows the influence of WWTP effluents and/or agricultural runoffs. These are well-known sources of antropogenic pollutants, including nitrites, estrogens, tensoactives, and many other compounds, many of them capable of triggering the observed dioxin-like activity. Therefore, we concluded that the fish-scale assay was able to detect changes in the quality of the waters that cannot be predicted by any of the normally measured parameters.

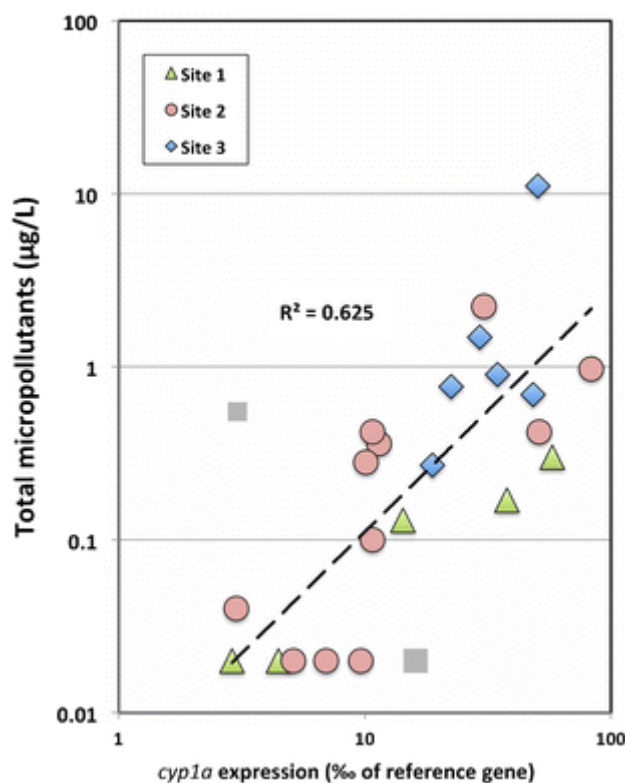


Fig. 4 Double-log correlation between *cyp1a* mRNA levels in fish scales and the total amount of micropollutants (see Table 2) in the water samples fish were exposed to. Sites are indicated by different symbols and colors; the power regression curve is indicated along with the corresponding R^2 value. Two outliers (gray squares) were not included in the regression

Conclusions

The analysis of *cyp1a* mRNA levels in scales of zebrafish exposed to environmental and spiked samples represent a valid alternative method to detect pollutants in water by the detection of their dioxin-like biological activity. This test has the advantage that it does not imply animal killing (most fish recover without major problems) and, to our knowledge, it is among the very few able to detect biological effects from natural water samples, without a pre-concentration step, and after only 24 h exposure. This relative short exposure time opens the possibility that the effectors may reach the scale tissue through diffusion (i.e., directly from water) instead of through the blood stream. The former hypothesis would open the question of the role of the slime covering fish scales on the kinetics and putative bioaccumulation of pollutants. However, induction of *cyp1a* in scales via blood stream is not excluded by our results, as we observed an even faster induction of the homologous gene in goldfish scales after intraperitoneal injection of β -naphthoflavone [5]. For comparison, analysis of the same gene in liver requires dissection of the individuals (which takes considerably more time) and 2 to 4 days of

exposure (data not shown [5]). The use of the small zebrafish simplifies logistics and reduces considerably the required aquarium volume, as they need about a tenth of the water required for goldfish, for example. As a downside, zebrafish seem more delicate (they do not stand successive daily scales removal, as goldfish do [5]), and the small size of the scales makes it necessary to amplify the obtained RNA by WTA. This is a relatively costly step, but ensures that one to three zebrafish provide enough mRNA for the analyses, and it does not introduce any distortion in the calculated *cyp1a* mRNA levels. The method is able to detect variations in water quality, likely from anthropogenic origin, which are undetected or poorly quantified by the standard physicochemical analyses, and compares favorably in terms of cost and time requirements to advanced analytical chemistry methods.

Acknowledgements

This work has been financially supported by R+ i Alliance (<http://www.ri-alliance.com/site/RIA/home>). Additional support from the Spanish Ministry of Science and Innovation (CGL2008-01898, AQUATOXIGEN) and Generalitat de Catalunya (2009SGR924) is also acknowledged. The authors acknowledge L. Pouget and A. Serrano (CETaqua) for the help provided with the Llobregat map creation and M. Casado (IDAEA) for her technical support.

References

1. Fehr M, Pereira AFN, Barbosa AKA (2009) Supporting waste and water management with proactive legal instruments. *Resour Conserv Recycl* 54(1):21–27
2. Allan IJ, Mills GA, Vrana B, Knutsson J, Holmberg A, Guigues N, Laschi S, Fouillac AM, Greenwood R (2006) Strategic monitoring for the European Water Framework Directive. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 25(7):704–715
3. Allan IJ, Vrana B, Greenwood R, Mills GA, Roig B, Gonzalez C (2006) A "toolbox" for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta* 69(2):302–322

4. Hansen PD (2007) Risk assessment of emerging contaminants in aquatic systems. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 26(11):1095–1099
5. Quiros L, Raldua D, Navarro A, Casado M, Barcelo D, Pina B (2007) A noninvasive test of exposition to toxicants: quantitative analysis of cytochrome P4501A expression in fish scales. *Environ Toxicol Chem* 26(10):2179–2186
6. Goksoyr A, Forlin L (1992) The cytochrome-P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat Toxicol* 22:287–311
7. McClain JS, Oris JT, Burton GA Jr, Lattier D (2003) Laboratory and field validation of multiple molecular biomarkers of contaminant exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 22:361–370
8. Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE (2000) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol* 30(4):347–570
9. Nebert DW, Puga A, Vasiliou V (1993) Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 685:624–640
10. Hankinson O (1995) The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:307–340
11. Sutter TR, Tang YM, Hayes CL, Wo YY, Jabs EW, Li X, Yin H, Cody CW, Greenlee WF (1994) Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J Biol Chem* 269:13092–13099
12. Lavado R, Urena R, Martin-Skilton R, Torreblanca A, Del Ramo J, Raldúa D, Porte C (2006) The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River. *Environ Pollut* 139:330–339

13. Machala M, Matlova L, Svoboda I, Nezveda K (1996) Induction effects of polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons and other widespread aromatic environmental pollutants on microsomal monooxygenase activities in chick embryo liver. *Arch Toxicol* 70(6):362–367
14. Arukwe A (2002) Complementary DNA cloning, sequence analysis and differential organ expression of beta-naphthoflavone-inducible cytochrome P4501A in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 133:613–624
15. Dixon TJ, Taggart JB, George SG (2002) Application of real time PCR determination to assess interanimal variabilities in CYP1A induction in the European flounder (*Platichthys flesus*). *Mar Environ Res* 54:267–270
16. Garcia-Reyero N, Raldua D, Quiros L, Llaveria G, Cerda J, Barcelo D, Grimalt JO, Pina B (2004) Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish. *Anal Bioanal Chem* 378(3):670–675
17. Piña B, Casado M, Quirós L (2007) Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 26(11):1145–1154
18. Elwing H, Karlsson JO, Grundstrom N, Gustafsson AL, von Schenck H, Sundgren H, Odman S, Andersson RG, Lundstrom I (1990) Fish scales as biosensors for catecholamines. *Biosens Bioelectron* 5:449–459
19. Suzuki N, Yamamoto M, Watanabe K, Kambegawa A, Hattori A (2004) Both mercury and cadmium directly influence calcium homeostasis resulting from the suppression of scale bone cells: the scale is a good model for the evaluation of heavy metals in bone metabolism. *J Bone Miner Metab* 22:439–446
20. Lehane DB, McKie N, Russell RG, Henderson IW (1999) Cloning of a fragment of the osteonectin gene from goldfish, *Carassius auratus*: its expression and potential regulation by estrogen. *Gen Comp Endocrinol* 114:80–87

21. Rotllant J, Redruello B, Guerreiro PM, Fernandes H, Canario AV, Power DM (2005) Calcium mobilization from fish scales is mediated by parathyroid hormone related protein via the parathyroid hormone type 1 receptor. *Regul Pept* 132:33–40
22. Navarro A, Quiros L, Casado M, Faria M, Carrasco L, Benejam L, Benito J, Diez S, Raldua D, Barata C, Bayona JM, Pina B (2009) Physiological responses to mercury in feral carp populations inhabiting the low Ebro River (NE Spain), a historically contaminated site. *Aquat Toxicol* 93(2–3):150–157
23. Pfaffl M (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* 29:e45
24. Quiros L, Pina B, Solee M, Blasco J, Lopez MA, Riva MC, Barcelo D, Raldua D (2007) Environmental monitoring by gene expression biomarkers in *Barbus graellsii*: laboratory and field studies. *Chemosphere* 67(6):1144–1154
25. Eljarrat E, Martinez MA, Sanz P, Concejero MA, Pina B, Quiros L, Raldua D, Barcelo D (2008) Distribution and biological impact of dioxin-like compounds in risk zones along the Ebro River basin (Spain). *Chemosphere* 71(6):1156–1161
26. Olivares A, Quiros L, Pelayo S, Navarro A, Bosch C, Grimalt JO, Fabregat MD, Faria M, Benejam L, Benito J, Sole M, Barata C, Pina B (2010) Integrated biological and chemical analysis of organochlorine compound pollution and of its biological effects in a riverine system downstream the discharge point. *Sci Total Environ* 408(22):5592–5599
27. Hoogenboom L, Traag W, Bovee T, Goeyens L, Carbonnelle S, Van Loco J, Beernaert H, Jacobs G, Schoeters G, Baeyens W (2006) The CALUX bioassay: current status of its application to screening food and feed. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 25(4):410–420

-
28. Seidel SD, Li V, Winter GM, Rogers WJ, Martinez EI, Denison MS (2000) Ah receptor-based chemical screening bioassays: application and limitations for the detection of Ah receptor agonists. *Toxicol Sci* 55:107–115
29. Miller CA 3rd (1997) Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. Activation of transcription by indole compounds. *J Biol Chem* 272:32824–32829
30. Noguerol TN, Boronat S, Casado M, Raldua D, Barcelo D, Pina B (2006) Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. *Anal Bioanal Chem* 385:1012–1019
31. Hirobe M, Goda Y, Okayasu Y, Tomita J, Takigami H, Ike M, Tanaka H (2006) The use of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the determination of pollutants in environmental and industrial wastes. *Water Sci Technol* 54(11–12):1–9
32. Cespedes R, Lacorte S, Raldua D, Ginebreda A, Barcelo D, Pina B (2005) Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). *Chemosphere* 61(11):1710–1719
33. Brix R, Postigo C, Gonzalez S, Villagrasa M, Navarro A, Kuster M, de Alda MJ, Barcelo D (2010) Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants. *Anal Bioanal Chem* 396(3):1301–1309
34. Meucci V, Arukwe A (2006) The xenoestrogen 4-nonylphenol modulates hepatic gene expression of pregnane X receptor, aryl hydrocarbon receptor, CYP3A and CYP1A1 in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 142(1–2):142–150
35. Matthews J, Gustafsson JA (2006) Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal* 4:e01

Article 2: Anàlisi biològic i químic integrat de la contaminació per compostos organoclorats i els seus efectes biològics en un sistema fluvial aigües avall del punt de descarrega.

Alba Olivares, Laia Quirós, Sergi Pelayo, Anna Navarro, Carme Bosch, Joan O. Grimalt, Maria del Carme Fabregat, Melisa Faria, Lluís Benejam, Josep Benito, Montserrat Solé, Carlos Barata, Benjamin Piña.

La contaminació dels sistemes fluvials, juntament amb els seus efectes biològics, pot propagar-se aigües avall, fins i tot, a distàncies considerables. En aquest treball es va analitzar la contaminació per compostos organoclorats (OC) a la part baixa del riu Ebre (nord-est d'Espanya), a partir d'on es troba situada una fàbrica de procés clor-àlcalí fins a la desembocadura. Els nivells màxims d'OC i de l'activitat biològica associada als compostos tipus dioxina, es troben a les mostres recollides directament dels residus de la fàbrica, i persisteix als sediments del riu a uns 40 km aigües avall (Xerta). L'anàlisi biològic de la carpa local (*Cyprinus carpio*) mitjançant bioassaigs a diferents nivells - EROD (activitat proteica), expressió de l'mRNA de CYP1A al fetge, Índex Hepatosomàtic, Factor de Condició, i l'índex de micronuclis en sang perifèrica - van mostrar un patró similar, amb un impacte màxim a Ascó, a pocs quilòmetres aigües avall de la planta, i una clara reducció en Xerta. Aquesta combinació de dades químiques, moleculars, cel·lulars i fisiològiques permet una avaluació precisa dels efectes negatius de la planta de clor-àlcalí tant en la qualitat dels sediments del riu com en els peixos i suggereix que els sediments poden ser un reservori per a les substàncies tòxiques, fins i tot en entorns dinàmics com els rius.

Paraules clau: Mecanisme Multimarcador; Biomonitorització; Micronuclis; Receptor d'hidrocarbur d'Àril; Assaig de Llevat Recombinant; PCR a temps real Quantitativa

Article 2. Integrated biological and chemical analysis of organochlorine compound pollution and of its biological effects in a riverine system downstream the discharge point

Alba Olivares^a, Laia Quirós^a, Sergi Pelayo^a, Anna Navarro^a, Carme Bosch^a, Joan O. Grimalt^a, Maria del Carme Fabregat^a, Melisa Faria^a, Lluís Benejam^b, Josep Benito^b, Montserrat Solé^c, Carlos Barata^a, Benjamin Piña^a

a - Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC), Jordi Girona, 18, 08034 Barcelona, Spain; b - Institut d'Ecologia Aquàtica, Dept. Ciències Ambientals, Ecologia, Universitat de Girona, 17071 Girona, Spain; c - Institut de Ciències del Mar (ICM-CSIC), Pg. Marítim de la Barceloneta 37-49 08003 Barcelona, Spain

Pollution in riverine systems, along with its biological effects, may propagate downstream even at considerable distances. We analyzed the organochlorine compound (OC) pollution in a section of the low Ebro River (Northeast Spain) downstream a long-operating chlor-alkali plant. Maximal levels of OCs and of their associated dioxin-like biological activity occurred in residue samples from the plant, and persisted in river sediments some 40 km downstream (Xerta site). Biological analysis at multiple organization levels in local carp (*Cyprinus carpio*, EROD, Cyp1A mRNA expression in the liver, hepatosomatic index, condition factor, and micronuclei index in peripheral blood) showed a similar pattern, with a maximal impact in Ascó, few kilometres downstream the plant, and a clear reduction at Xerta. This combination of chemical, molecular, cellular and physiological data allowed the precise assessment of the negative impact of the chlor-alkali plant on the quality of river sediments and on fish, and suggests that sediments may be a reservoir for toxic substances even in dynamic environments like rivers.

Article history: Received 22 February 2010; revised 3 August 2010; accepted 5 August 2010. Available online 30 August 2010.

Keywords: Multimarker approach; Biomonitoring; Micronuclei; Aryl hydrocarbon receptor; Recombinant yeast assay; Quantitative real-time PCR

1. Introduction

The EU Directive 2000/60/EC (the “water framework directive” or WFD) declares as a major objective the prevention of any further deterioration of the chemical and biological statuses of aquatic ecosystems and associated wetlands. To meet this objective, WFD demands multi-level (or multi-tier) approaches, combining chemical analytical and biological methods (Fuerhacker, 2009). In this paper, we study the burden by organochlorine compounds (OC) and their biological impact in the lower course of the Ebro River (Northeast Spain), using a combination of chemical, molecular, cellular and physiological methods.

The Ebro River catchment is the largest river basin in Spain, with an area of 85,362 km² and a stable population of more than 3 million people (<http://www.chebro.es>). Its lower course is chronically polluted by a chlor-alkali plant operating in Flix, 120 km from the river's mouth, since the beginning of the 20th century. During this extended operational period, large amounts of heavy polluted industrial sludge accumulated in the adjacent dam. These sediments contain Tm quantities of organochlorine compounds and mercury, among other minor pollutants (Bosch et al., 2009, Fernández et al., 1999, Llorente et al., 1987 and Pastor et al., 2004). The accumulation and biological effects of these substances in local populations of molluscs, fish and birds have been evaluated only recently (Carrasco et al., 2008, Eljarrat et al., 2008, Navarro et al., 2009 and Quirós et al., 2008). Whereas mercury pollution represents a major concern, as its contents in fish surpass the legal limits for consumption (Navarro et al., 2009), the presence of very high levels of different OCs (PCBs, HCH, DDE, HCB and PeCB) in the residues also deserves a close surveillance, due to its putative detrimental effects on human and animal health. These organochlorine compounds were generated during different periods of the plant operational life and remain in the plant residues at very high mounts, despite that many of them are currently banned or not produced any longer. In a previous report, fish from the Flix dam showed physical responses associated to chemical pollution, specifically to coplanar PCB congeners (Eljarrat et al., 2008). The present work aims to study the spread of the burden associated to this chemical pollution downstream the river by chemical, molecular and physiological criteria.

Coplanar PCB congeners are representatives of the so-called “dioxin-like” pollutants, which include dioxins, furans and different polycyclic aromatic hydrocarbons. The presence of these compounds is associated to many deleterious effects in vertebrates, as immune dysfunction, endocrine disruption, reproductive toxicity, developmental defects, and cancer (Abbott et al., 1994, Poland and Knutson, 1982 and Safe et al., 1997). Dioxin-like compounds share the key structural property of binding and activate the vertebrate Aryl hydrocarbon Receptor (AhR), a ligand-activated transcription factor that regulates specific phases I and II metabolic enzymes, among other functions (Hankinson, 1995, Hayes et al., 1996 and Nebert et al., 1993).

Activation of AhR constitutes the initial step of the metabolic chain leading to toxic effects of a variety of harmful pollutants, such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-(p)-dioxin (TCDD), coplanar PCBs and benzopyrenes (Abbott et al., 1994, Poland and Knutson, 1982 and Safe et al., 1997). Therefore, assays to detect AhR activation and subsequent signal transduction are becoming an extremely useful approach to monitor pollution loads in environmental samples (Fent, 2003). In this work we used a yeast-based bioassay in which the yeast genetic make-up is modified to reconstruct at least partially the vertebrate AhR signaling pathway (Miller, 1997). In this genetic setup, the production of a reporter gene is diagnostic for the presence of AhR ligands in the medium, and can be quantified as an enzymatic activity with high precision (Noguerol et al., 2006b).

Among genes directly regulated by AhR, and therefore, activated by dioxin-like pollutants, Cytochrome P450 1A (Cyp1A) has been developed as an established biomarker of exposure to agonists of AhR in many vertebrate species, including fish (Arukwe, 2002, McClain et al., 2003 and Rees and Li, 2004). The increase on its expression levels upon the presence of AhR ligands may be evaluated at least at two levels, either by measuring one of its associated enzymatic activities, the ethoxyresorufin O-deethylase activity (EROD) (Lavado et al., 2006, Machala et al., 2001 and Solé et al., 2003), or by analyzing changes in transcription of the Cyp1A gene by realtime PCR techniques (Eljarrat et al., 2008, Piña et al., 2007 and Quirós et al., 2007a). In this work, we used both techniques to describe the impact by dioxin-like pollution in wild carp populations.

Biochemical and gene expression biomarkers are useful tools to detect possible and specific environmental impacts, but they do not constitute per se a proof of any detrimental effect on the fitness of the studied animals. Toxic effects at higher organization levels can be analyzed with parameters involving whole tissues or the whole organism. At tissue level, the presence of high proportions of micronuclei in the peripheral blood, the micronuclei index or MNI, is an indicative of cellular or genetic damage in the sensitive hematopoietic process. High MNI values have been related to genotoxicity in different vertebrate species, including fish (al-Sabti and Metcalfe, 1995; Bolognesi et al., 2006; Fernández et al., 1993; Llorente et al., 2002; Muller et al., 1996; Quirós et al., 2008 and Russo et al., 2004). Similarly, changes in the relative size liver, the hepatosomatic index, is considered an indicator of chemical burden, and it has been associated to different forms of chemical pollution, including OC (Miller et al., 1998 and Zhang and Hu, 2008) (Carrola et al., 2009 and Hagenaaars et al., 2008). Finally, the Fulton's body condition factor is a non-lethal morphometric index that compares the weight and the cube of the length of individual fish (Fulton, 1904). This index assumes that, within a given species, heavier fish of a given length are in better condition than leaner ones, providing therefore an indication of the health and nutritional status of fish.

Environmental risk assessment often encounters a typical scale problem. Studies performed at organism or population levels have a high ecological significance, but lack the immediateness and the sensitivity to sublethal exposures offered by assays at molecular or cellular levels. On the other hand, chemical, molecular or biochemical parameters can detect toxic molecules or their biological activities at concentrations far below the ones required to affect the fitness of the exposed animals, but these findings lack the necessary information about their relevance in a physiological, ecological or, for humans, epidemiological context (Adams et al., 1992 and van der Oost et al., 2003). In this work, we intended to cope with this problem by using a multilevel approach (chemical, molecular, cellular and physiological) to describe the effects of pollutants generated by the Flix chlor-alkali plant when carried downstream to the lower course of the Ebro River.

2. Materials and methods

2.1. Site description and sediment and residue sampling

The study area covers 100 km of the low course of the Ebro River, from the large Ribarroja dam to Amposta, considering the upstream limit of the Ebro Delta (Fig. 1). This river section includes a small water reservoir adjacent to the Flix chlor-alkali plant and to which it discharges its effluents (see inset a, the top of Fig. 1). These discharges originated a large mass of residues close to the factory (see grey area on the inset in Fig. 1). Two overflow dams at the locations of Ascó and Xerta represent artificial barriers for fish and likely constitute points of increased sedimentation (see grey bars in Fig. 1). Ten composite surficial sediment samples were collected from the first 40 cm sediment layer during spring and summer 2006 (Fig. 1, Table 1, samples A, B, H, I, J, K, L, and N). Industrial residues from the Flix factory (see the upper inset of Fig. 1) were sampled in a previous survey (Grimalt, 2010; samples C to F, Table 1). Residues were cored all throughout its depth (1.2 to 3.5 m, depending on the position of sampling) and divided in 3-cm sections. These sections were analyzed individually for chemical contents. AhR-RYA results correspond to combined extracts of all sections from each core. Samples M, O, P, and Q correspond to river sediments sampled simultaneously to the residue cores (Grimalt, 2010). Once collected, samples were homogenized and stored at 4 °C in darkness until testing.

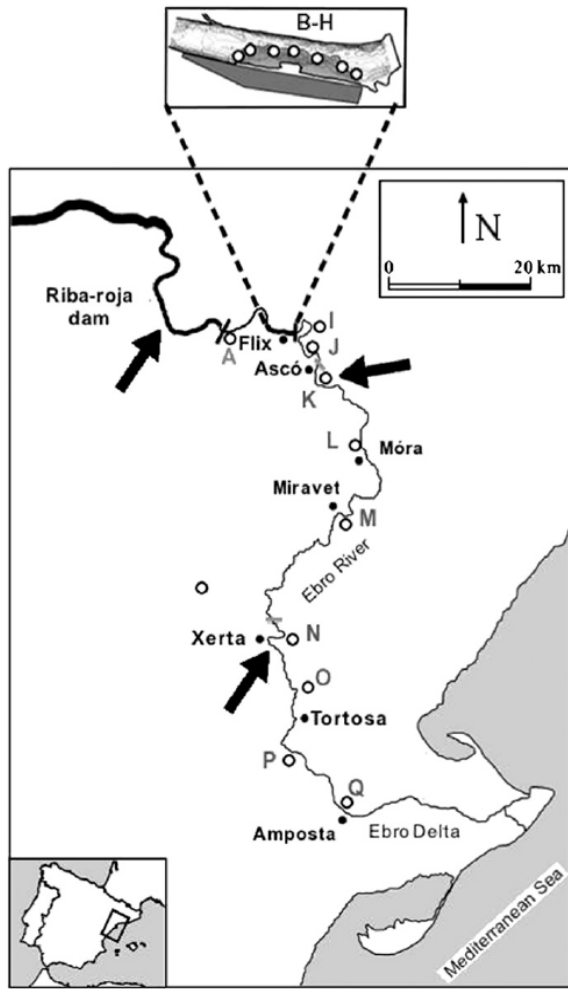


Fig. 1. Map of the low course of the Ebro River with indication of sampling sites. Approximate position of dams (black bars) and overflow dams (grey bars) is indicated. Empty dots mark the approximate sediment and core sampling sites; they are identified by upper case letters (A-Q), as listed in Table 1. The inset on the top shows a detail of the Flix chlor-alkali plant (grey polygon at the bottom), the adjacent dam and the area of the reservoir covered by industrial residues (grey area). Approximate sampling locations are represented as above. Black arrows indicate the three sites in which fish were sampled. Relevant locations (black dots) and geographical features are also shown. The inset at the bottom locates the represented area in the Iberian Peninsula.

Table 1
Characterisation of sediment and core sample from the Low Ebro River.

Sampling point ^a	Localisation	Latitude N	Longitude E	NFEQ (µg/g)	Organochlorine compounds (ng/g)													
					PeCB	HCB	α-HCH	β-HCH	γ-HCH	PCB-28	PCB-52	PCB-101	PCB-118	PCB-153	PCB-138	PCB-180	4,4'-DDE	4,4'-DDT
A	Riba-roja dam	41 14.3717'N	00 25.9673'E	0.02	0.6	3.1	1.7	1.8	0.3	21	7.3	0.7	0.3	1.6	2.2	17	3.6	1.7
B	Flix residues (surface)	41 13.9014'N	00 32.1177'E	0.49	1300	5570	37	222	83	552	354	10	11	18	25	20	260	442
C	Flix residues (core ^b)	41 13.9172'N	00 32.2020'E	3.91	6488	21137	50	166	63	486	199	181	93	275	444	345	459	262
D	Flix residues (core ^b)	41 13.9223'N	00 32.2697'E	3.28	13078	36072	42	421	42	750	406	232	134	167	296	178	705	256
E	Flix residues (core ^b)	41 13.9098'N	00 32.3210'E	4.12	15486	45549	50	137	57	5272	2419	1250	624	225	434	250	693	356
F	Flix residues (core ^b)	41 13.9061'N	00 32.4041'E	0.81	38944	104076	25	105	47	151	274	294	122	1187	2177	1019	895	1300
G	Flix residues (core ^b)	41 13.8862'N	00 32.4755'E	7.35	1765	21718	5.2	4.7	0.7	25	7	9	9	321	540	379	107	194
H	Flix residues (surface)	41 13.8566'N	00 32.5195'E	0.96	3603	15137	0.6	0.3	0.2	29	15	39	35	14	29	24	316	482
I	Flix-Ascó	41 14.7085'N	00 33.4514'E	0.04	9.1	232	0.6	1.7	0.2	69	77	293	388	838	1117	168	42	354
J	Flix-Ascó	41 13.5669'N	00 32.9396'E	1.38	18	124	0.6	0.9	0.9	12	5	8	6	28	31	85	30	402
K	Ascó	41 10.9587'N	00 3.201'E	0.09	4.3	138	0.3	0.8	0.3	10	5	8	9	20	28	27	16	163
L	Móra	41 05.4833'N	00 3.551'E	0.98	3.4	51	0.2	0.8	0.3	16	15	18	16	33	59	17	40	350
M	Miravet	41 01.8000'N	00 35.3500'E	0.20	15	480	3.6	6	43	9.3	11.0	1.6	7.1	22	37	11	43	146
N	Xerta	40 46.8500'N	00 31.2333'E	0.01	3.1	99	2.4	4.6	0.2	1.5	0.7	1.6	2.6	3.7	4.0	5.9	18	399
O	Xerta-Tortosa	40 55.3347'N	00 29.6706'E	0.26	0.7	28	0.2	0.2	2.6	8.9	8.3	6.8	4.0	7.6	15	18	71	71
P	Tortosa	40 50.9333'N	00 31.5833'E	0.01	0.1	40	2.4	39	2.6	6.1	6.1	4.5	2.4	3.2	6.0	21	11	95
Q	Amposta	40 43.7000'N	00 34.4500'E	0.01	150	1.8	1.8	2.9	2.1	6.1	6.1	4.5	2.4	3.2	6.0	21	11	95

^a See locations in Fig. 1.

^b Aggregated values for core samples (0 to 1.2–3.2 m, depending on sampling point).

Common carp (*Cyprinus carpio*) specimens were captured by direct current electric pulse, anesthetized in ice and its length and weight measured. They were sacrificed by decapitation and sexed by visual inspection of gonads. The livers were dissected, weighted and a small sample (50 mg) was placed in a cryogenic vial with 1 mL RNAlater (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), transported to the laboratory on ice, and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for mRNA analysis. The rest of the liver was immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for biochemical determinations. Blood samples (0.5 mL) were obtained by puncture of the caudal vein and centrifuged in situ at 1500 rpm for 2 min. The supernatant (plasma) was gently removed and the pellet resuspended in sterilized citrate buffer, placed on ice and immediately transported to the laboratory for micronuclei analysis (Quirós et al., 2008). Hepatosomatic index was calculated as the percentage of the total body weight corresponding to the liver. Condition factor was calculated as hundred times the ratio of weight in grams divided by the cube of the length in cm.

2.3. Analysis of organochlorine compounds

Organochlorine compounds in sediment samples were extracted and analyzed as described with minor modifications (Carrizo et al., 2007 and Grimalt et al., 2004). Dried sediment samples (0.5–1 g) were extracted in parallel with laboratory blanks by sonication (three extractions, 20 min each) using a mixture of 20 mL of n-hexane/dichloromethane (4:1 v/v). The three extracts were combined, spiked with a surrogate recovery standard (PCB congeners 30 and 200), reduced to 2 mL by vacuum rotary evaporation and cleaned-up with concentrated sulphuric acid. Finally, extracts were vacuum evaporated to 0.5 mL and sulfur-containing compounds were removed using activated copper, which was subsequently eliminated by filtration through anhydrous sodium sulfate and n-hexane rinsing. Elution solvent and rinses were concentrated to 100 μL in isooctane by rotary vacuum and nitrogen stream evaporation.

Pentachlorobenzene (PeCB), hexachlorobenzene (HCB), α -, β - and γ -hexachlorocyclohexanes (HCHs), PCB congeners 28, 52, 101, 118, 153 and 180, p,p'-

DDE and p,p'-DDT were analyzed by GC-ECD (Agilent Technologies, model 6890N, Palo Alto, CA, USA) with a 60 m × 0.25 mm i.d. DB-5 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA) coated with 5% phenyl 95% methylpolysiloxane (film thickness 0.25 μm). Before chromatographic analysis, an internal standard of PCB 142 was added to correct for instrument variability. The instrument was operated in splitless mode (closed for 1.5 min) and the oven temperature program started at 90 °C (held for 2 min) to 130 °C at 15 °C/min, and then to 290 °C at 4 °C/min (holding time 20 min). Injector and detector temperatures were 280 °C and 320 °C, respectively. Helium and nitrogen were used as carrier (1.5 mL/min) and make-up (60 mL/min) gases respectively.

Calibration curves were performed for each compound to be quantified. Mean recovery values of the surrogates PCB 30 (56 ± 16%) and PCB 200 (85 ± 10%) were used to correct quantitative data of more and less volatile compounds, respectively. Blank levels were used to calculate the limits of detection (LOD), which ranged between 0.001 and 0.03 ng g⁻¹.

2.4. Recombinant yeast assay

AhR-based recombinant yeast assays (AhR-RYA) were performed as previously described (Noguerol et al., 2006a and Noguerol et al., 2006b). The YCM4 yeast strain (Miller, 1997) was grown overnight in minimal medium (6.7 g/L) yeast nitrogen base without amino acids plus ammonium sulfate (DIFCO, Basel, Switzerland) supplemented with 0.1 g/L of prototrophic markers as required and with galactose as a carbon source to express AhR and the cofactor ARNT (Miller, 1999). The final culture was adjusted to an optical density (OD) of 0.1 and split into 100 μL aliquots in 96-well polypropylene microtiter plates (NUNC™, Roskilde, Denmark; Garcia-Reyero et al., 2001) previously silylated by overnight exposure to an atmosphere of dimethylsilane. We performed a serial dilution scheme based on 1:3 dilution steps and using glass microcapillary tubes rather than pipette tips for all liquid transfers, to eliminate contact with plastic surfaces (Garcia-Reyero et al., 2001). Plates were incubated for 4 h at 30 °C under mild shaking. After incubation, 100 μL YPER™ (PIERCE™, Rockford, IL, USA) was added to each well and further incubated at 30 °C for 30 min. Afterwards,

100 μ L of assay buffer supplemented with 0.1% 2- β -mercaptoethanol and 0.5% of the 4-methylumbelliferone β -D-galactopyranoside (MuGal) solution (both from the FluorAce™ beta-galactosidase Reporter Assay Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) was added to the lysed cells. After brief centrifugation, plates were read in a Victor3 Wallac spectrofluorometer (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA, USA), at 355 nm excitation and 460 nm emission wavelengths. Fluorescence was recorded for 15 to 20 min (one measurement per min); β -galactosidase activity values were calculated as rates of the increment of arbitrary fluorescence units with time, using standard linear regression methods. To test possible inhibitory activity, yeast cultures were incubated for 4 h with 2 μ M of β -naphthoflavone, added to a 1:30 dilution of each sample, and processed as before. Samples were tested in triplicate. AhR ligand activity values were calculated as naphthoflavone equivalents, NFEQ from dose-response curves by adjusting the data to a first-order Hill equation, as described (Noguerol et al., 2006a).

2.5. Cyp1A gene expression analysis

Total RNA was extracted from tissue samples as previously described (Garcia-Reyero et al., 2004). Total RNA concentration was estimated by spectrophotometric absorption at 260 nm in a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies; Delaware, DE), treated with DNaseI (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) and reverse-transcribed to cDNA (Omniscript, Qiagen, Valencia, CA) and stored at -20° C. Specific transcripts were quantified by real-time PCR in a Abi Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the SYBR Green chemistry (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems). Gene specific primer sets were designed using the Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems). β -actin forward primer: 5' GCGTAAATACTCTGTCTGGATCGGAGG 3'; β -actin reverse primer: 5' GTTTAGAAGCATTGCGGTGGACG 3' (Genebank accession number M24113, 131 bp); CYP1A forward primer: 5' CCTTCCTTCCTTCACCATTCCCTC 3'; reverse primer, CTTGTTCAGGTCCGTACCATCCGC (Genebank accession number AB048939, 189 bp). Relative expression values were calculated according to Eq. (1) using threshold cycle (Ct) values from triplicate assays as previously described (Pfaffl, 2001).

PCR efficiency values for β -actin and the target gene, EAct and ETg, were calculated as described (Pfaffl, 2001). Results are given in copies of Cyp1A mRNA per 1000 copies of β -actin mRNA (referred to as % of reference gene, for simplicity). The sequence of amplified PCR products was confirmed by DNA sequencing in Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) and sequences compared to GenBank references AB048939 for Cyp1A and M24113 for β -actin (Quirós et al., 2007b). The suitability of β -actin as a reference gene was assessed by the BestKeeper program (Pfaffl et al., 2004; data not shown).

2.6. EROD analysis

EROD activity was determined in the liver microsomal fractions as described (Lavado et al., 2004). Briefly, after weighing, the livers were flushed with ice cold 1.15% KCl, and homogenized in 1:5 w/v of cold 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer, pH 7.4, containing 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mM phenanthroline, and 0.1 mg/ml trypsin inhibitor. Homogenates were centrifuged at 12,000 \times g for 20 min. The 12,000 \times g supernatant was further centrifuged at 100,000 \times g for 60 min to obtain microsomal fractions. Microsomal pellets were resuspended in a small volume of 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer, pH 7.4, containing 1 mM EDTA, 20% w/v glycerol, 1 mM DTT, 0.1 mM phenanthroline, and 0.1 mg/ml trypsin inhibitor. Microsomal proteins were measured by the method of Lowry (Lowry et al., 1951), using bovine serum albumin as standard. EROD activity was determined at 30 °C essentially as described (Burke and Mayer, 1974). Liver microsomes (10 ml) were incubated for 10 min in a final volume of 1.0 ml containing 90 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer, pH 7.4, 0.22 mM NADPH, and 3.8 mM 7-ethoxyresorufin. The reaction was stopped by adding 2 ml of ice-cold acetone, samples were centrifuged at 900 \times g for 10 min, and 7-hydroxyresorufin fluorescence was determined in a SFM-25 spectrofluorimeter (Kontron Instruments, Bletchley, UK) at 537/583 nm excitation/emission wavelengths.

2.7. Micronuclei quantitation

Citrated blood samples were counted and further diluted in citrate buffer to 106 cell/50 μ l. This erythrocyte suspension was treated by a two-step technique as described (Nusse and Marx, 1997). One milliliter of solution I (584 mg/liter NaCl, 1 μ g/liter Na-Citrate, 10 mg/ml RNase from bovine pancreas, 0.3 ml/liter Nonidet p-40, and 25 μ g/ml ethidium bromide (EB)) was added to 50 μ l of cell suspension. After 1 h at room temperature, 1 ml of solution II (15 mg/ml citric acid, 0.25 M sucrose, and 40 μ g/ml EB) was added and maintained at 4 °C until analysis. DNA frequency distributions of stained nuclei and micronuclei were analyzed using a Coulter XL flow cytometre (Beckman Coulter, Fullerton, CA); proportions of micronuclei relative to total erythrocyte nuclei was calculated from forward scattering vs. fluorescence plots as described (Llorente et al., 2002 and Quirós et al., 2008). The fraction of micronuclei present in samples is referred to as ‰ of total counted nuclei.

2.8. Statistical analysis

All statistics were performed using the SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, Ill.) package. Values are presented as means \pm SEM (Standard Error of Means). Non-parametric tests were preferred when comparing very different sets of data; normality of data distribution was assessed by the Kolmogorov–Smirnov test. Bivariate correlations between different parameters were analyzed by the Pearson correlation (normal distributions) or by the non-parametric Spearman rank correlation test (not normal distributions). Statistical comparisons of mean values were made using a one-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey's post-hoc analysis.

3. Results

3.1. OC levels in residues from the Flix factory and Ebro River sediments

Industrial residues from the Flix factory showed extremely high concentrations of different OCs, exceeding 100 $\mu\text{g/g}$ of sediment in at least one of the cores (Fig. 2A, Table 1). River sediments sampled downstream Flix showed a gradual decrease in OC contents, only exceeding the 10 $\mu\text{g/g}$ mark in a single case (Sample J, very close to the Flix dam, Fig. 1). OC levels were further reduced in sediments sampled downstream Xerta, with OC contents well under the 1 $\mu\text{g/g}$ mark (samples N–Q, Table 1, Fig. 2A), suggesting a progressive decrease of the chemical pollution along the river course. However, even these low levels from downstream river sediments exceeded by almost a factor of magnitude the OC content of sample A, taken a few km upstream the factory (Table 1, Fig. 1 and Fig. 2). These data indicates that OC pollution in the studied area originated at the Flix factory.

The relative importance of different OC families varied along the studied area. Residues sampled near the factory (samples B–H) were predominantly polluted by PeCB and HCB (> 85% of total OC, Table 1, Fig. 2B), probably reflecting the relevance of these compounds in the factory output. In contrast, sediments sampled downstream showed a large proportion of pp'-DDE and pp'-DDT, as well as of different PCB congeners. This distribution probably reflects the persistence and hydrophobicity of these compounds and, hence, their ability to persist and accumulate in the sediments. The low levels of OC in sample A corresponded essentially to PCB congeners, arguably among the most persistent OC present in the environment (Fig. 2B).

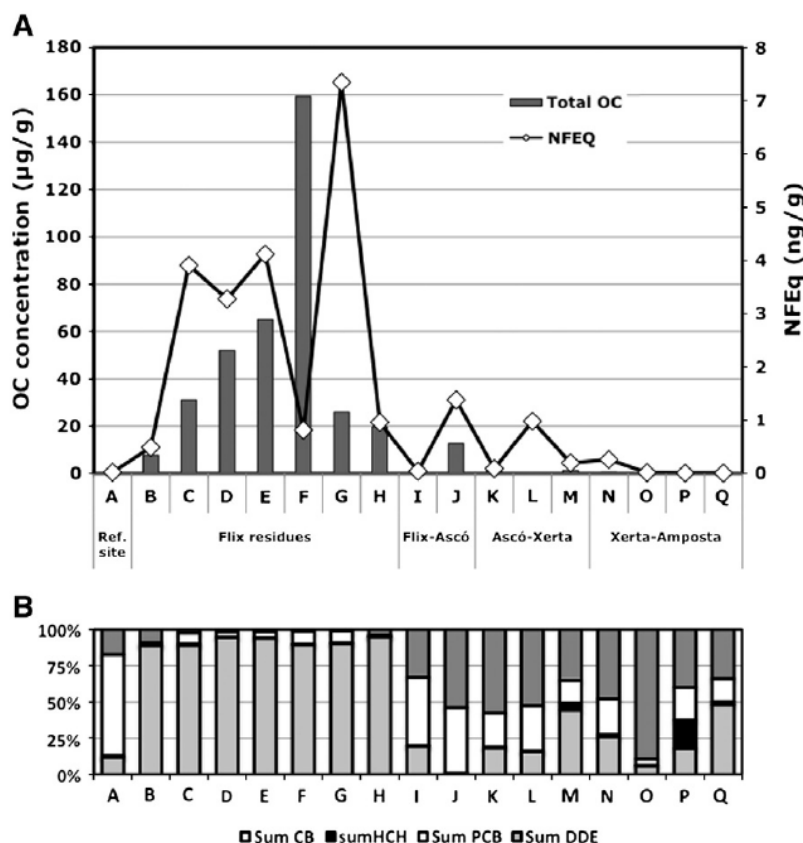


Fig. 2. A) Profile of the AhR ligand activity (square diamonds and solid line, right scale) and total OC content (grey bars, left scale) from sediment and residue samples from the low Ebro River. Samples are labelled as in Fig. 1 and Table 1; their location in the different sections of the studied portion of the river is also indicated. B) Relative composition in OC families in residues and sediment samples. CB (pale grey), eCB+HCB; HCH (black), hexachlorocyclohexane isomers; PCB (empty), sum of PCB congeners; DDE (dark grey, pp'-DDE+pp'-DDT).

3.2. AhR ligand activity in residues from the Flix factory and Ebro River sediments

Total AhR ligand activity in residue and sediment samples, as measured by AhR-RYA, showed a profile very similar to that of the total OC content on the same samples (Fig. 2A). Maximal activity corresponded to residues, followed by river sediments sampled between the Flix dam and Xerta (samples I to M). Very low values, close to detection limits, were found downstream Xerta (samples N to Q) and upstream the factory (Fig. 2, Table 1). Fig. 2A shows some discrepancies between the chemical content and AhR activity (notably, samples F, G and L) we attribute to the complexity of the samples and the combined action of agonistic and antagonistic signals. Spearman's rank test showed

a very strong correlation ($p < 0.001$) between AhR ligand activity values and total OC, PeCB, and PCB118 contents (Table 2). These results suggest a very complex mix of AhR ligands in sediment and residue samples, most probably OC. The distribution of the AhR ligand activity downstream Flix points the chlor-alkali plant as the likely origin for most of the pollution by dioxin-like compounds in the low Ebro River.

Table 2
Spearman rank correlation between dioxin-like activity in sediments and cores and contents in different OCs.

	<i>r</i> _{ho}	Sig. (2-tailed)	<i>n</i>
PeCB	0.759	0.001***	16
HCB	0.632	0.007**	17
a-HCH	0.417	0.156	13
b-HCH	0.477	0.062	16
g-HCH	0.267	0.402	12
PCB-28	0.734	0.001**	16
PCB-52	0.559	0.030*	15
PCB-101	0.728	0.001**	16
PCB-118	0.741	0.001***	17
PCB-153	0.674	0.003**	17
PCB-138	0.654	0.004**	17
PCB-180	0.685	0.003**	16
4,4'-DDE	0.677	0.004**	16
4,4'-DDT	0.396	0.116	17
Total PCB	0.693	0.002**	17
Total HCH	0.518	0.033*	17
Total DDE	0.636	0.006**	17
Total CB	0.627	0.007**	17
Total OC	0.786	0.000***	17

*, $p > 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

3.3. Physiological status of carp populations from the low Ebro River

Analysis of molecular, biochemical and cytological biomarkers and of body indexes showed a very similar picture of the effects of pollution in the sampled carp populations (Table 3). Values of Cyp1A mRNA abundance and of the activity of its associated enzymatic activity (EROD) were significantly higher for fish captured close to Ascó than that for the other two populations (Table 3). These two biomarkers are diagnostic for the presence of dioxin-like pollutants, due to their capacity to bind the AhR. High expression levels of Cyp1A were accompanied by a higher micronuclei frequency in peripheral blood, indicating possible genotoxic damage at the Ascó population. Hepatosomatic index values were significantly higher in this population, which also showed a significantly poorer condition factor. These data indicate a biological impact in the fish population inhabiting just few km downstream Flix, and that the impact is reduced to essentially upstream values after Xerta. The similarity of this pattern to the

distribution of both OC content and AhR ligand activity (Fig. 2, Table 3) suggests a relationship of these biological effects with chemical pollution from the Flix factory.

All five biomarkers analyzed here showed a close correlation between them (Table 4). This mutual correlation suggests a common origin for the observed negative effects, namely the presence of OC in the river. In this regard, it is revealing the close correlation between high levels of Cyp1A mRNA, indicative for dioxin-like pollution, and low condition factor values or high micronuclei counts (Fig. 3); the expected correlation between Cyp1A mRNA abundance and its associated enzymatic activity (EROD) is also shown for comparison (Fig. 3). These data suggest that the poor condition factor and hepatosomatic indices showed by the impacted populations were closely related to the presence of AhR ligands in the river.

4. Discussion

Our data show a consistent picture of a strong environmental impact in the approximately 50 km between the Flix factory and the Xerta overflow dam. At the chemical level, this impact translates itself in elevated levels of different OCs and of AhR ligand activity in river sediments; these levels return to almost basal (upstream Flix) levels for samples taken downstream Xerta. Fish captured nearby the Ascó overflow dam show clear genetic and molecular signals of exposure to dioxin-like (i.e., AhR ligand) compounds, such as elevated levels of hepatic Cyp1A mRNA and of EROD activity. These biomarkers of chemical impact were accompanied by alterations of the micronuclei index (a typical marker for genotoxicity), increased liver size relative to the body weight (possible indication of liver inflammation or abnormal growth), and poorer condition factor — a general indicator of malnutrition or loss of fitness. As many dioxinlike pollutants are recognized mutagens and cancer promoters, we consider it likely that all these biomarkers have a common origin. These data show, therefore, not only a significant loss of fitness for the Ascó fish population, but also provide a causal explanation for it, namely the dioxin-like substances contained in the residues of the chlor-alkali plant. A recent multi-tier analysis of different species of fish from this area showed significant decreases in condition and fecundity of carp, roach (*Rutilus rutilus*)

and pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*) populations (Benejam et al., 2010). Therefore, it is likely that the effects observed in our study can be generalized to many, if not all, fish species inhabiting the low Ebro River.

Table 3
Physical characteristics and biomarker values for fish samples used in this study.

	Sampling site								ANOVA p-value
	Riba-roja		Ascó			Xerta			
	Average	n	Average	p ^a	n	Average	p ^a	n	
Sex ratio (1–male, 2–female)	1.5 ± 0.5	13	1.4 ± 0.5	N/A	10	1.8 ± 0.5	N/A	8	
Weight (kg)	4.3 ± 1.3	13	2.6 ± 0.8	**	10	3.7 ± 0.8		8	
Length (cm)	57.8 ± 5.9	13	53.6 ± 5.2		10	57.0 ± 4.0		8	
Condition factor (g cm ⁻³)	2.2 ± 0.3	13	1.6 ± 0.1	***	10	2.0 ± 0.2		8	
Hepatosomatic index (% body weight)	1.6 ± 0.3	13	2.2 ± 0.4	***	10	1.7 ± 0.6		8	
Micronuclei index(‰)	1.3 ± 0.6	4	22.1 ± 15.9	*	4	5.7 ± 5.4		7	
EROD (pmol min ⁻¹ mg prot ⁻¹)	16.0 ± 9.8	13	218.6 ± 177.1	***	10	91.7 ± 59.5	***	8	
Cyp1A gene expression (‰ reference gene)	122.6 ± 86.6	12	2313.3 ± 1952.4	***	9	444.8 ± 219.7	***	7	

*, p>0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

N/A, not applicable.

^a Differences from the Riba-roja fish population, Student's t-test.

In a recent paper, we described the distribution and physiological responses to mercury pollution in the same section of the Ebro River (Navarro et al., 2009). Mercury is used in the process of OC production by the chlor-alkali plant, and a part of it is discharged into the Ebro River. Mercury loads were maximal downstream Xerta, and no evident health problems appeared associated to mercury loads, in some cases exceeding 1 mg/Kg of muscle. In fact, the only physiological responses associated to mercury (elevated levels of GSH in the liver and of MT mRNA abundance in the kidney and scales) were related to metabolic acclimation to the continuous presence of mercury rather than to a direct damage (Navarro et al., 2009). This is at variance with both the distribution and putative biological effects of the pollutants monitored here. Unlike mercury, OC contents and AhR ligand activity in sediments were maximal at or near the discharging point, and a clear correlation was observed between its concentration and different markers of biological impact in fish. Therefore, we concluded that dioxin-like pollutants appeared to be a much more severe threat for the fish health status than mercury, independently from their impact on human health. It is important to stress that at least some of the observed effects may be related to the combination of both types of pollution, as fish populations may integrate effects from various stressors, either directly or via the food chain. These putative combined effects of mercury and OC pollution remain to be further studied.

The WFD refers to water quality in terms of “ecologically clean water”, and this obviously includes effects on both vertebrate and invertebrate populations. In previous

reports, a battery of biochemical biomarkers was used to detect the effects of the Flix factory on local populations of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*). The results indicated an oxidative stress in the populations downstream Flix sediments compared to those sampled upstream (Faria et al., 2010). These effects included elevated levels of antioxidant enzymes, like CAT, GPX, and GST, as well as increased DNA damage and lipid peroxidation levels. These toxic effects were dissected by using *Daphnia magna* feeding tests. Lye, on onehand, and heavy metals, on the other, appeared as the most active toxicants for *Daphnia* whereas OCs showed toxic effects only in vertebrate-based assays (Bosch et al., 2009). This is relevant to the interpretation of the effects of the combination of pollutants present in the Flix residues in different animal groups, for the key factor determining toxicity by OCs in vertebrates is the activation of the AhR. This process does not occur in protostomata, in which the AhR homologous transcription factors are apparently devoid of any ligand-binding domain (Hahn, 2002 and Nebert et al., 1993).

Table 4
Bivariate Pearson correlations for different fish biomarkers.

	Condition factor	Hepatosomatic index	EROD	Cyp1A gene expression	MNI (%)
Condition factor	1	-0.430 (31)*	-0.408 (31)*	-0.441 (28)*	-0.439 (15)
Hepatosomatic index		1	0.318 (31)	0.456 (28)*	0.357 (15)
EROD			1	0.900 (28)**	0.849 (15)**
Cyp1A gene expression				1	0.948 (13)**
MNI (%)					1

*, p>0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

It is important to stress that all these chemical burdens and physiological consequences for fish occurred at concentrations of OC or mercury in the river water well below the acceptable levels for human consumption. Public weekly data on water quality control performed in Ascó and other sites by the Ebro Water Authority (Confederación Hidrográfica del Ebro, <http://195.55.247.234/bajoebro/>) showed only very sporadic episodes of OC and Hg levels above detection limits for the last 8 years. We conclude that the observed impact in fish (and invertebrates) likely comes from pollutants present in sediments and/or particulate matter, which are not reflected in the standard water quality analysis. Particularly, our data suggests that sediments may be a reservoir for toxic substances even in dynamic environments like rivers, and argue for their routinely analysis in water quality control programs.

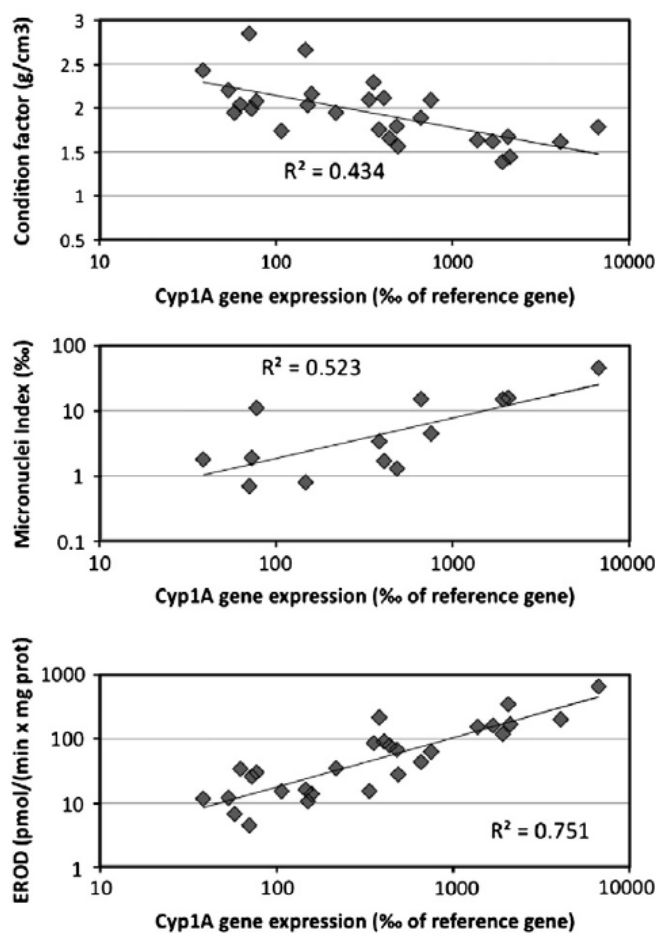


Fig. 3. Double logarithmic correlations between Cyp1A gene expression and EROD (left), condition factor (centre) and micronuclei index (right). Power regression lines and R^2 values are also shown.

Acknowledgments

This work has been supported by the Spanish Ministry for Science and Innovation (CGL2008- 01898/BOS), the Spanish Ministry for the Environment and the Catalan Water Agency (ACA) of the Generalitat de Catalunya.

Referentes

Abbott BD, Perdew GH, Birnbaum LS. Ah receptor in embryonic mouse palate and expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;126:16–25.

Adams SM, Crumby WD, Greeley Jr MS, Shugart LR, Saylor CF. Responses of fish populations and communities to pulp mill effluents: a holistic assessment. *Ecotoxicol Environ Saf* 1992;24:347–60. al-Sabti K, Metcalfe CD. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res* 1995;343:121–35.

Arukwe A. Complementary DNA cloning, sequence analysis and differential organ expression of betanaphthoflavone- inducible cytochrome P4501A in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002;133:613–24.

Benejam L, Benito J, Garcia-Berthou E. Decreases in condition and fecundity of freshwater fishes in a highly polluted reservoir. *Water Air Soil Pollut* 2010;210:231–42.

Bolognesi C, Perrone E, Roggieri P, Pampanin DM, Sciutto A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquat Toxicol* 2006;78(Suppl 1):S93–8.

Bosch C, Olivares A, Faria M, Navas JM, del Olmo I, Grimalt JO, et al. Identification of water soluble and particle bound compounds causing sublethal toxic effects. A field study on sediments affected by a chloralkali industry. *Aquat Toxicol* 2009;94:16–27.

Burke MD, Mayer RT. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos* 1974;2:583–8.

Carrasco L, Diez S, Soto DX, Catalan J, Bayona JM. Assessment of mercury and methylmercury pollution with zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the Ebro River (NE Spain) impacted by industrial hazardous dumps. *Sci Total Environ* 2008;407:178–84.

Carrizo D, Grimalt JO, Ribas-Fito N, Sunyer J, Torrent M. Influence of breastfeeding in the accumulation of polybromodiphenyl ethers during the first years of child growth. *Environ Sci Technol* 2007;41:4907–12.

Carrola J, Fontainhas-Fernandes A, Matos P, Rocha E. Liver histopathology in brown trout (*Salmo trutta f. fario*) from the Tinhela River, subjected to mine drainage from the abandoned Jales Mine (Portugal). *Bull Environ Contam Toxicol* 2009;83:35–41.

Eljarrat E, Martinez MA, Sanz P, Concejero MA, Piña B, Quirós L, et al. Distribution and biological impact of dioxin-like compounds in risk zones along the Ebro River basin (Spain). *Chemosphere* 2008;71:1156–61.

Faria M, Huertas D, Soto DX, Grimalt JO, Catalan J, Riva MC, et al. Contaminant accumulation and multibiomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro River (NE Spain). *Chemosphere* 2010;78:232–40.

Fent K. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol Lett* 2003;140–141:353–65.

Fernández M, L'Haridon J, Gauthier L, Zoll-Moreux C. Amphibian micronucleus test(s): a simple and reliable method for evaluating in vivo genotoxic effects of freshwater pollutants and radiations. Initial assessment. *Mutat Res* 1993;292:83–99.

Fernández M, Alonso C, González M, Hernández L. Occurrence of organochlorine insecticides, PCBs and PCB congeners in waters and sediments of the Ebro River (Spain). *Chemosphere* 1999;38:33–43.

Fuerhacker M. EU water framework directive and Stockholm convention: can we reach the targets for priority substances and persistent organic pollutants? *Environ Sci Pollut Res Int* 2009;16(Suppl 1):S92–7

Fulton T. The rate of growth of fishes. *Annu Rep Fish Board Scotland* 1904;22:141–241.

Garcia-Reyero N, Grau E, Castillo M, López de Alda MJ, Barceló D, Piña B. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environ Toxicol Chem* 2001;20:1152–8.

Garcia-Reyero N, Raldua D, Quirós L, Llaveria G, Cerda J, Barcelo D, et al. Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish. *Anal Bioanal Chem* 2004;378:670–5.

Grimalt JO. http://mediambient.gencat.cat/cat/ciudadans/informacio_ambiental/Flix/estudi.jsp?ComponentID=42291&SourcePageID=42851#1. Last accession, August 2010.

Grimalt JO, van Drooge BL, Ribes A, Vilanova RM, Fernández P, Appleby P. Persistent organochlorine compounds in soils and sediments of European high altitude mountain lakes. *Chemosphere* 2004;54:1549–61.

Hagenaars A, Knapen D, Meyer IJ, van der Ven K, Hoff P, De Coen W. Toxicity evaluation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat Toxicol* 2008;88:155–63.

Hahn ME. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 2002;141:131–60.

Hankinson O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:307–40.

Hayes CL, Spink DC, Spink BC, Cao JQ, Walker NJ, Sutter TR. 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9776–81.

Lavado R, Thibaut R, Raldua D, Martin R, Porte C. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;196:247–57.

Lavado R, Urena R, Martin-Skilton R, Torreblanca A, Del Ramo J, Raldúa D, et al. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River. *Environ Pollut* 2006;139:330–9.

Llorente GA, Farran A, Ruiz X, Albaiges J. Accumulation and distribution of hydrocarbons, PCBs and DDTs in tissues of three species of anatidae from the Ebro Delta (Spain). *Arch Environ Contam Toxicol* 1987;16:563–72.

Llorente MT, Martos A, Castano A. Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural populations of carp. *Ecotoxicology* 2002;11:27–34.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.

Machala M, Dusek L, Hilscherova K, Kubinova R, Jurajda P, Neca J, et al. Determination and multivariate statistical analysis of biochemical responses to environmental contaminants in feral freshwater fish *Leuciscus cephalus*, L. *Environ Toxicol Chem* 2001;20:1141–8.

McClain JS, Oris JT, Burton Jr GA, Lattier D. Laboratory and field validation of multiple molecular biomarkers of contaminant exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 2003;22:361–70.

Miller III CA. Expression of the human aryl hydrocarbon receptor complex in yeast. Activation of transcription by indole compounds. *J Biol Chem* 1997;272:32824–9.

Miller C. A human aryl hydrocarbon receptor signaling pathway constructed in yeast displays additive responses to ligand mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;160:297–303.

Miller HC, Mills GN, Bembo DG, MacDonald JA, Evans CW. Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in *Trematomus bernacchii* as an indicator of environmental pollution in Antarctica: assessment by quantitative RT-PCR. *Aquat Toxicol* 1998;44:183–93.

Muller WU, Nusse M, Miller BM, Slavotinek A, Viaggi S, Streffer C. Micronuclei: a biological indicator of radiation damage. *Mutat Res* 1996;366:163–9.

Navarro A, Quirós L, Casado M, Faria M, Carrasco L, Benejam L, et al. Physiological responses to mercury in feral carp populations inhabiting the low Ebro River (NE Spain), a historically contaminated site. *Aquat Toxicol* 2009;93:150–7.

Nebert DW, Puga A, Vasiliou V. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann NY Acad Sci* 1993;685:624–40.

Noguerol T, Boronat S, Jarque S, Barceló D, Piña B. Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta* 2006a;69:351–8.

Noguerol TN, Boronat S, Casado M, Raldua D, Barcelo D, Piña B. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. *Anal Bioanal Chem* 2006b;385:1012–9.

Nusse M, Marx K. Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages. *Mutat Res* 1997;392:109–15.

Pastor D, Sanpera C, González-Solís J, Ruiz X, Albaigés J. Factors affecting the organochlorine pollutant load in biota of a rice field ecosystem (Ebro Delta, NE Spain). *Chemosphere* 2004;55:567–76.

Pfaffl M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity:

BestKeeper– Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 2004;26:509–15.

Piña B, Casado M, Quirós L. Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. *TrAC, Trends Anal Chem* 2007;26:1145–54.

Poland A, Knutson JC. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1982;22:517–54.

Quirós L, Jarque S, Lackner R, Fernández P, Grimalt JO, Piña B. Physiological response to persistent organic pollutants in fish from mountain lakes: analysis of Cyp1A gene expression in natural populations of *Salmo trutta*. *Environ Sci Technol* 2007a;41:5154–60.

Quirós L, Piña B, Solé M, Blasco J, López MA, Riva MC, et al. Environmental monitoring by gene expression biomarkers in *Barbus graellsii*: laboratory and field studies. *Chemosphere* 2007b;67:1144–54.

Quirós L, Ruiz X, Sanpera C, Jover L, Piña B. Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (N.E. Spain). *Environ Pollut* 2008;155:81–7.

Rees C, Li W. Development and application of a real-time quantitative PCR assay for determining CYP1A transcripts in three genera of salmonids. *Aquat Toxicol* 2004;66:357–68.

Russo C, Rocco L, Morescalchi MA, Stingo V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004;57:168–74.

Safe S, Connor K, Ramamoorthy K, Gaido K, Maness S. Human exposure to endocrineactive chemicals: hazard assessment problems. *Regul Toxicol Pharmacol* 1997;26: 52–8.

Solé M, Raldúa D, Barceló D, Porte C. Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones, and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003;56:373–80.

van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2003;13: 57-149.

Zhang Z, Hu J. Effects of p,p'-DDE exposure on gonadal development and gene expression in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *J Environ Sci (China)* 2008;20:347–52.

5.2 CAPÍTOL 2: Estudi dels efectes subletals dels disruptors tiroïdals en els primers estadis del desenvolupament a *Danio rerio*.

Article 3. Canvis induïts per la Triiodotironina en el transcriptoma de Zebrafish durant la fase embrionària. Implicacions del Bisfenol A en la toxicitat en el desenvolupament.

Sergi Pelayo¹, Eva Oliveira¹, Benedicte Thienpont¹, Patrick J. Babin², Demetrio Raldúa¹, Michèle André², and Benjamin Piña¹

¹Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC). Jordi Girona, 18. 08034 Barcelona, Spain. ²University of Bordeaux, Maladies Rares: Génétique et Metabolisme (MRGM), EA 4576, 33400 Talence, France.

La disrupció tiroïdal durant els primers estadis del desenvolupament es un tema d'actualitat amb unes grans implicacions en la salut humana. En aquest escrit presentem una anàlisi del transcriptoma dels gens regulats per l'hormona tiroïdal durant els primers estadis del desenvolupament embrionari (dels dies 2 a 5 després de ser fertilitzats) per tal de detectar possibles marcadors per a la disrupció tiroïdal. L'exposició a 3,5,3'-triode-L-Tiroxina (T3, 50nM) indueix canvis a una petita fracció (menys del 2%) del transcriptoma de zebrafish, amb una important part de gens involucrats en el sistema hematopoètic, formació de l'ull, i sistema ossi, incloent el gen *thra* pertanyent al receptor de l'Hormona Tiroïdal. Alguns dels canvis transcripcionals es poden observar a nivell macroscòpic, com una disminució en la mida de l'ull i l'augment en el nivell de senyal en la hibridació de *thra* en el teixit esquelètic. Utilitzant aquesta informació els canvis en la transcripció de tres gens (Alfa globulina adulta *si:ch211-5k11.6*, globulina embrionària *hbae* i la opsina de les cèl·lules tipus con *opn1/w1*) s'han analitzat per tal de monitoritzar els efectes del sospitós disruptor tiroïdal Bisfenol A (BPA) durant el desenvolupament embrionari. El BPA actua com un agonista de T3 si actua en solitari, però presenta un efecte additiu actuant conjuntament amb concentracions subsegüents de T3. En el test de disrupció per immunofluorescència quantitativa de tiroxina (TIQDT), el BPA no impedeix la síntesi de tiroxina per part dels Fol·licles Tiroïdals, un punt de referència per als goitrògens. Els nostres resultats indiquen que el BPA potencia l'efecte endogen de T3 en les primeres fases de desenvolupament i demostra la

necessitat d'utilitzar metodologies *in vivo* per avaluar els perills de la disrupció tiroïdal en els primers estadis de desenvolupament dels vertebrats.

Paraules Clau: Goitrogen, Disrupció endocrina, microarrays, qRT-PCR, Receptor Hormona Tiroïdal, Expressió gènica, Hibridació in situ.

Abreviatures: BPA, Bisfenol A; MMI, metimazol; MTC, Concentració Màxima Tolerable; TDC, Disruptor Tiroïdal; TIQDT, Test de disrupció quantitatiu mitjançant immunofluorescència; TR, Receptor Hormona Tiroïdal.

Article 3. Triiodothyronine-Induced Changes in the Zebrafish Transcriptome During the Eleutheroembryonic Stage. Implications for Bisphenol-A Developmental Toxicity.

Sergi Pelayo¹, Eva Oliveira¹, Benedicte Thienpont¹, Patrick J. Babin², Demetrio Raldúa¹, Michèle André², and Benjamin Piña¹

¹Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC). Jordi Girona, 18. 08034 Barcelona, Spain. ²University of Bordeaux, Maladies Rares: Génétique et Métabolisme (MRGM), EA 4576, 33400 Talence, France.

Thyroid disruption during early development is a current matter of concern due to its significant human health implications. We present here a transcriptome analysis of thyroid hormoneregulated genes in zebrafish during the eleutheroembryonic stage (days 2 to 5 post fertilization) to detect potential markers of thyroid disruption. Exposure to 3,5,3'-triiodo-L-thyroxine (T3, 50 nM) induced changes in a minor portion (less than 2%) of the zebrafish transcriptome, with a significant fraction of genes involved in the haematopoietic system, eye formation, and ossification/skeletal system, including the thyroid receptor *thra* gene. Some of the transcriptomic changes were reflected macroscopically, as an allometric decrease of eye size and an increase on *thra* hybridization signal in the skeletal tissue. Using this information, changes on transcription of three genes (adult alpha globin gene *si:ch211-5k11.6*, embryonic globin gene *hbae3*, and long wavelength cone opsin gene *opn1/w1*) were analyzed to monitor the effect of the suspected thyroid disrupter bisphenol A (BPA) on the thyroid system during this period of development of zebrafish. BPA acted as a weak T3 agonist when tested alone, but it strongly enhanced the effect of subsaturating concentrations of T3. In thyroxine immunofluorescence quantitative disruption tests (TIQDT), BPA did not prevent the ability of thyroid follicles to synthesize thyroxine, a landmark for direct goitrogens. Our results suggest that BPA potentiates the effect of endogenous T3 in early development and demonstrate the requirement for the use of *in vivo*, multi-endpoint methods to evaluate thyroid disruption hazards on early developmental processes in vertebrates.

Keywords: Goiter, endocrine disruption, microarrays, qRT-PCR, thyroid hormone receptor, gene expression, in situ hybridization.

Abbreviations: BPA, bisphenol A; MMI, methimazole; MTC, maximum tolerated concentration; TDC, thyroid-disrupting chemical; TIQDT, immunofluorescence quantitative disruption test; TR, thyroid hormone receptor

1. Introduction

Thyroid hormones are central in many physiological processes in vertebrates, including development, growth and behavior (Scholz and Mayer, 2008). There is a growing concern about endocrine-disrupting compounds targeting the thyroid system, the so-called thyroid-disrupting chemicals or TDCs, especially during the first stages of the development (Brent, 2007; Brouwer et al., 1998; Takser et al., 2005). As a response to those concerns, specific guidance on high throughput methods for screening TDCs have been proposed (OECD, 2006). There are many examples of TDCs disrupting key steps in the complex TH regulatory network, including TH synthesis, binding to thyroid transport proteins, metabolism, or transactivation of target genes containing thyroid response elements (Brent et al., 2007; Raldúa and Babin, 2009). This plurality of possible targets makes it challenging to determine from among a very long list of potential thyroid toxicants, primarily tested in rodent and in vitro models, which are relevant to human thyroid function (Brent et al., 2007). Very likely, a single assay would never be able to detect all possible TDC activities in the ever-growing number of chemicals continuously released into the environment (Raldúa and Babin, 2009). Zebrafish (*Danio rerio*) is becoming a preferred model for the analysis of sublethal effects of toxicants in vertebrates (Scholz and Mayer, 2008; Stegeman et al., 2010). Zebrafish are easy to maintain, have a short life cycle, and readily produce relatively large quantities of transparent embryos, the development of which has been extensively studied and can be observed using a variety of optical methods. The excellent current knowledge of the zebrafish genome and the availability of many genetic and molecular biology tools allows precise analysis of the observed processes at the molecular level. Moreover, and unlike purely in vitro (or in culture) models, the embryos allow the possibility to integrate alternative modes of action, an essential aspect of TDC action. Finally, under the last EU directive on the protection of animals used for scientific purposes, animal welfare rules only apply to fish larvae capable of independent feeding (EC, 2010). Development of fish strongly depends on temperature and the onset of independent feeding could significantly vary. After analysis of different criteria such as functional morphology of the digestive tract, swimming ability, behaviour and yolk consumption, the onset of independent feeding of zebrafish at standard breeding temperature (28.5°C; Kimmel et al., 1995) can most likely be set to 120 hours post-

fertilization (hpf; Belanger et al., 2010, Strähle et al., 2011). Assays performed before this stage accord with 3Rs principles (relative replacement of animal tests), a target for many international regulatory bodies (Embry et al., 2010).

In previous papers, we described a convenient bioassay, the thyroxine (T4) immunofluorescence quantitative disruption test (TIQDT) to evaluate the potential of chemicals to disrupt thyroid gland function in zebrafish eleutheroembryos (Raldúa and Babin, 2009; Thienpont et al., 2011). TIQDT is most useful to analyze disruptors of the thyroid gland morphogenesis and function. In this paper we used microarray technology to identify genes that respond to the presence of thyroid hormones in the developing zebrafish at the same exposure window (48 to 120 hpf). Our aim is to develop a test for compounds that bind to the thyroid hormone receptors (TRs) or that can modify their biological activity.

Bisphenol A (BPA) is one of the world's most widely-manufactured chemicals, with an annual production of about 2.2 million tons (Melzer et al., 2010). It is mainly used as a building block of polycarbonate plastic. As this kind of plastic is widely used in many food containers, from water bottles to baby bottles, any release of BPA from these bottles result in a global exposure of the human population (Vandenberg et al., 2009). Prenatal exposure to BPA interferes with embryonic programs of development, morphological sex differentiation, sex differentiation of the brain and behavior, and immune responsiveness (Golub et al., 2010). Whereas some of these effects could be related to it acting as an estrogenic compound, there is growing evidence that at least some of them are mediated by its interaction with other signaling pathways, like the thyroid or cardiac systems (Brent et al., 2007; Crofton, 2008; Schmutzler et al., 2007; Zoeller, 2005; Zoeller et al., 2005). In this work, we analyze the possible effects of BPA in the developing zebrafish thyroid system by combining the newly developed quantitative mRNA markers with TIQDT. We consider this multi-endpoint approach as particularly adequate to address the inherent complexities of the thyroid disruption, using methodologies compliant with the 3Rs principle.

2. Material and methods

2.1 Zebrafish eleutheroembryo maintenance

Zebrafish (*Danio rerio*) embryos and eleutheroembryos were obtained by natural mating and raised at 28.5 °C (Kimmel et al., 1995) with a 12L:12D photoperiod in embryo water [90 µg/mL of Instant Ocean (Aquarium Systems, Sarrebourg, France; <http://zfin.org/>), 0.58 mM CaSO₄·2H₂O, dissolved in reverse osmosis purified water]. Animal stages were recorded as days or hours postfertilization (dpf or hpf).

2.2 Chemicals and eleutheroembryo treatment

T3 (3,3',5-triiodo-L-thyroxine), bisphenol A (BPA), methimazole (MMI) and DMSO were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All dilutions are reported as nominal concentrations. Stocks solutions were prepared in DMSO on the day of the experiment. Experimental solutions with the same final concentration of DMSO (0.1%) were directly prepared in embryo water. Zebrafish eleutheroembryos (48 hpf, just starting the hatching phase) were exposed to T3, BPA, a combination of both chemicals, or MMI, for 72 h, ending before the first feeding (120 hpf), as described for TIQDT (Raldúa and Babin, 2009). For microarray experiments, eleutheroembryos were exposed to 50 nM T3 (Helbing et al., 2010; Liu and Chan, 2002) in 100-mL glass beakers, with 50 eleutheroembryos in each. Eleutheroembryos were transferred to a new plate or beaker with freshly prepared test solutions every other day. Five, 15, and 50 nM T3 were used concentration-response experiments. Maximum tolerated concentration for BPA (MTC, lethality) was calculated experimentally at 4 mg/L, a value coincident with previous data (Berghmans et al., 2008; Owens, 2007). This value was set as the maximum for dose-response and TIQDT experiments. RNA from embryos from 1 to 6 dpf was extracted as described for the exposure experiments (15 embryos/eleutheroembryos per extraction, 5 biological replicates for each time point.)

2.3 RNA extraction and microarray analysis

Total RNA was isolated from 50 eleutheroembryos using Trizol reagent protocol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). RNA concentration was measured by spectrophotometric absorption at 260nm in a NanoDrop ND-8000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) and the quality checked by Agilent 2100

Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara CA). RIN (RNA integrity) values ranged between 8.5 and 8.9. Microarray studies were performed using the Zebrafish Gene Expression Microarray Kit (Agilent) by Imagenes GmbH (Berlin, Germany), using one-color strategy. The study included three biological replicates (independent eleutheroembryos pools either untreated or treated with 50 nM T3) and a technical replicate (a duplicated RNA sample, labeled and hybridized independently) from one of them (results deposited at GEO, reference GSE23315). No statistical differences were observed between technical and biological replicates (not shown). Data were analyzed using the MultiExperiment viewer MeV4 software (Saeed et al., 2003), using log₂ values and the standard normalization protocol.

2.4 RNA quantitation by qRT-PCR

Total RNA was isolated from 15 eleutheroembryos per replicate and analyzed as above. Each datapoint represents at least three biological replicates. RNA was treated with DNaseI (Ambion, Austin, TX) to remove genomic DNA contamination, and retro-transcribed to cDNA using First Strand cDNA Synthesis Kit (F. Hoffmann-La Roche, Basel Switzerland). Appropriate primers for six test genes (*opn1/w1*, *thra*, *si:ch211-5k11.6*, *hbae3*, and *cyp26a1*) were designed using Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, sequences in supplementary table ST1). *ef1α* and *ppia2* were both used as reference genes (Morais et al., 2007), as mRNA levels of neither gene changed upon T3 treatment -tested with REST (Pfaffl et al., 2002), Supplementary ST3. PCR products (amplicons) were sequenced in an Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems), and compared to the corresponding reference sequences at NCBI server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, see primer sequences and amplicon lengths in ST1). Aliquots of 40 ng of total RNA were used to quantify specific transcripts in LightCycler® 480 Real-Time PCR System (F. Hoffmann-La Roche) using SYBR® Green Mix (Takara Bio INC, Siga, Japan). Amplification efficiencies were calculated as better than 90% for all tested genes as described (Pfaffl, 2001). Relative mRNA abundances of different genes were calculated from the second derivative maximum of their respective amplification curves (*C_p*, calculated by triplicates). *C_p* values for stress-related target genes (*C_{ptg}*) were normalized to the average *C_p* values of both reference genes for each sample, $^{corr}C_{p_{tg}} = C_{p_{tg}} - ((C_{p_{ef1\alpha}} + C_{p_{ppia2}}) / \text{average}(C_{p_{ef1\alpha}} + C_{p_{ppia2}}))$. Changes in mRNA abundance in samples

from different treatments were calculated by the $\Delta\Delta C_p$ method (Pfaffl, 2001), using corrected C_p values from treated and non-treated samples ($\Delta\Delta C_{p_{tg}} = {}^{corr}C_{p_{tg}} \text{ untreated} - {}^{corr}C_{p_{tg}} \text{ treated}$). In graphs and tables, mRNA abundance values are represented as mRNA copies of target gene per 1000 copies of the reference gene *ppia2* mRNA (% of reference gene, $1000 \times 2^{(C_{p_{ppia2}} - C_{p_{tg}})}$). Fold-change ratios were derived from these values.

2.5 Whole-mount in situ hybridization and immunohistochemistry

Antisense and sense digoxigenin-labeled zebrafish *thra* RNA probes were synthesized as previously described (Babin et al., 1997). Eleutheroembryos were hybridized at 61 °C with sense or antisense digoxigenin-labeled riboprobes (Morais et al., 2007). After coloration, eleutheroembryos were re-fixed in 4% paraformaldehyde and gradually transferred into 90% glycerol. Whole mount immunohistochemistry was performed following basically the protocol described in (Raldúa and Babin, 2009). A 50 min depigmentation step (3% H₂O₂ and 1% KOH in water) was introduced after dehydration, and the secondary antibody used was Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG. Differential interference contrast and fluorescence images were obtained using a Nikon Eclipse 90i (Nikon, Champigny sur Marne, France) microscope fitted with Nomarski optics and a Nikon Intensilight CHGFI unit. Images were acquired with a Nikon Digital Sight DS-Ri1 camera and NIS Elements AR software (version 3.0). Total body length (anterior-most part of the snout to posterior-most point of the tail) was measured on the left side of each fish and the maximum length of the eyes was measured on a dorsal view. Eye-to-body length ratios are expressed as percentage of total body length. Quantitative analysis of whole-mount T4 immunofluorescence signals was performed as described (Raldúa and Babin, 2009), using free-processing ImageJ software (National Institutes of Health (NIH), <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.6 Statistical analyses

Statistical tests were performed using the SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, Ill) package. All statistical calculations were performed using $\Delta\Delta C_p$ values; the normal distribution of this parameter was assessed by the Kolmogorov–Smirnov test. Differences among control and treated groups were analyzed by Student's t-test (2 groups) or ANOVA plus Tukey's tests (more than 2 groups). Differences in the ratio eye size/total length between control and T3-treated eleutheroembryos were also assessed using Student's t-test.

Statistical significance of the frequency of regulated genes in different subsets of data were performed using the hypergeometric distribution.

3. Results

3.1 Transcriptome and phenotypic effects of T3 exposure during early development of zebrafish

Exposure of 48 hpf-hatched eleutheroembryos to 50 nM of T3 for 3 days had no effect on mortality (<10%) and only minor effects at phenotypic level (Supplementary Figure SF1). Consistently with this low level of systemic effects, transcriptome analysis showed significant changes in only a minor portion of genes. From a total of 37,578 DNA probes in the microarray, 538 of them showed a significant ($p < 0.01$) increase on the corresponding mRNA abundance and 114 showed a decrease after 3 days of exposure to T3 (Supplementary figures SF2 and SF3). Gene Ontology (GO) analyses showed three major functional groups of transcripts affected by T3 (Table 1.) Group A included transcripts of genes related to ossification, skeleton formation and Ca ion binding, which includes the thyroid receptor *thra* gene. Transcripts of genes from group B are related to visual function, circadian cycle and retinoid metabolism, including different opsins and enzymes of the retinol/retinal cycle. Group C was constituted by hemoglobin transcripts, both embryonic and adult.

Some of the observed changes in the transcriptome were related to observed changes at the whole-animal level. For example, the reduction of most (11 out of 17) retina-related genes in T3-treated animals (Table 1) could correlate with the observed allometric decrease on the size of the eyes. The eye-to-body length ratios (in %) changed from 8.70 ± 0.08 ($n=27$) in control untreated eleutheroembryos to 8.37 ± 0.09 ($n=24$) in T3-treated animals ($p < 0.01$). Similarly, whole-mount in situ hybridization showed an increase of thyroid receptor *thra* mRNA in pectoral fins and in the pharyngeal arches region (Figure 1), a finding consistent with the preferential effect of T3 on bone and ossification genes (Table 1).

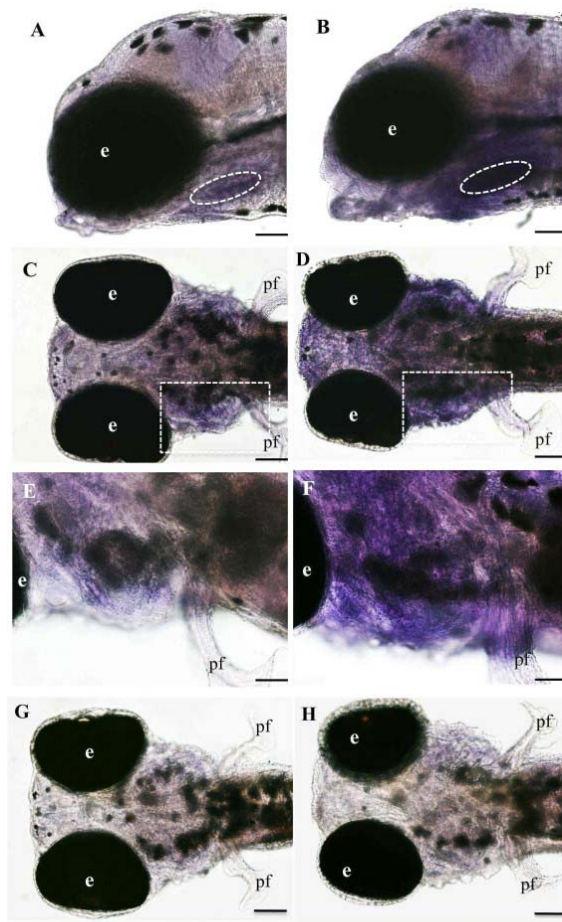


Figure 1

Fig. 1. Effect of T3 on *thra* transcript expression levels in zebrafish eleutheroembryos, evaluated by whole-mount in situ hybridization. (A, C, E and G) Control eleutheroembryos at 5 dpf. (B, D, F and H) T3 50 nM-treated eleutheroembryos at 5 dpf. Eleutheroembryos were hybridized with sense (data not shown) or antisense digoxigenin-labeled riboprobes. The hybridization signal is colored dark-blue to purple. The dark-brown color in the eyes and skin corresponds to pigmentation and is not a hybridization signal. No staining signal was observed in eleutheroembryos hybridized with the control sense probes (data not shown). Heads of representative eleutheroembryos are shown in lateral view with the anterior part to the left (A and B) or in ventral view with the anterior part to the left (C and D). Dashed ellipse on (A) and (B) shows the territory of the ceratobranchial cartilages. (E) and (F) are higher magnification images of the pharyngeal skeleton area selected with a dashed rectangle in (C) and (D), respectively. (G) and (H) show ventral views of embryos hybridized with a sense probe. Abbreviations: e, eye; pf, pectoral fin. Scale bar: 90 μ m in panels A and B; 100 μ m in panels C, D, G and H; and 50 μ m in panels E and F. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The observed changes in the relative abundance of hemoglobin genes correspond to a substitution of the embryonic globins by their adult counterparts. Figure 2A shows the relative abundance of the adult (pales shades of grey) and embryonic (dark grey) hemoglobin transcripts in treated and untreated control animals. This substitution takes place in the normal developing eleutheroembryos two to three weeks after fertilization (Figure 2B, data from <http://www.ebi.ac.uk/microarray/as/aer/result?queryFor=Experiment&eAccession=E-TABM-33>). Therefore, we concluded that T3 treatment switched the timing of the expression of different globin genes by at least one week. The increased transcript level of the long-wavelength opsin *opn1/w1* (Table 1) upon T3 treatment also follows this pattern, as this gene is only expressed at high levels after 14 dpf (line graph in Figure 2B).

Table 1. Functional analysis of expression changes upon T3 treatment.

Functional groups	Go terms	Up	Down	Changed ^a	Total genes in GO terms	p value ^b
(A) Ossification, skeleton, Ca ion binding	GO:0001503, GO:0001501, GO:0005509	<i>alox12, anxa1b, anxa3, asph, calua, cbs, dlx3b, edem1, egfl7, ehd2, epd, fklp10, frzb, icn, lect1, lox, mgp, mmp14a, mmp14b, mmp2, myf5, myl2, rcn3, tgfb1, thbs3a, thra, tp63, zgc:110283, zgc:162651, zgc:162879</i>	<i>guca1a, guca1b, tfa, zgc:114180, zgc:85932</i>	35	408	5.9×10^{-13}
(B) Visual function, light stimulation, circadian cycle, retinoid metabolism	GO:0007601, GO:0009416, GO:0042752, GO:0006776, GO:0005501	<i>opn1lw1, pitpna, tyr, cyp26a1, ptgds, retsat</i>	<i>rs1, pde6c, opn1sw2, grk7b, arntl2, opn1mw1, grk7a, exorh, per2, atoh7, pde6a</i>	17	97	8.6×10^{-12}
(C) Oxygen transport	GO:0015671	<i>ba2, hbbe2, si:ch211-5k11.6</i>	<i>hbae1, hbae3, hbbe3</i>	6	17	3.3×10^{-06}

^aOver or under represented in T3-treated samples. ^bHypergeometric distribution. Calculated over 752 significantly changed ($p < 0.01$) genes out of 28,115 annotated zebrafish genes.

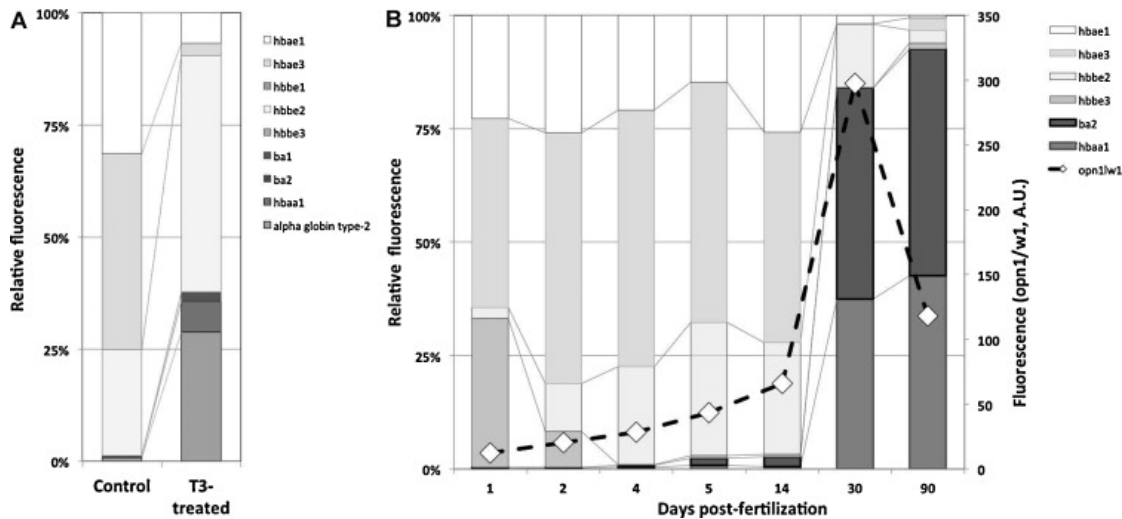


Fig. 2. Relative expression of embryonic and adult globin transcripts. (A) Cumulative fluorescence values for embryonic (pale shades of grey) and adult (dark grey) globin transcripts in untreated control (left) and 50 nM T3-treated eleutheroembryos (right), as calculated from the microarray data. (B) Relative expression of embryonic and adult globin transcripts (identical tone-codes, when applicable) during embryonic, larval and juvenile development of zebrafish (data from <http://www.ebi.ac.uk/microarray/as/aer/result?queryFor=Experiment&Accession=E-TABM-33>). Transcript levels of the long-wavelength opsin *opn1/w1* at the same time points are also shown (line graph, right scale).

Representatives of each affected GO functional group were selected for the design of real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) probes to both validate the microarray data and to use them as potential quantitative markers of TRs activation. Biological replicates of the microarray experiments, analyzed by qRT-PCR, corroborated the microarray data; the major discrepancy between both sets of data corresponded to the *opn1/w1* gene, whose induction in the microarray (some 1000-fold) appeared much stronger than the one quantified by qRT-PCR (20-fold, Table 2). In contrast, qRT-PCR data magnified the increase of alpha globin mRNA upon T3 treatment when compared to the figures obtained in the microarray analysis (Table 2).

A concentration/ response experiment with different concentrations of T3 showed a progressive up-regulation of adult globin transcript level and the concomitant down regulation of the embryonic one by increasing T3 concentration (Figure 3A). These data were in accordance to microarray results and indicated a lowest observable TH effect on globin transcript at levels between 5 and 15 nM T3 (see also Figure 4). Figure 3B shows that the relative proportion of both globin genes remains essentially stable all through the period of the assay in the absence of added T3.

Table 2. Comparison between fold changes on mRNA abundance for different putative markers of thyroid disruption upon T3 and BPA exposure, calculated from microarray and qRT-PCR data.

Gene name	Gene description	T3 (50 nM, microarray)			T3 (50 nM, qRT-PCR)			BPA (4 mg/L, qRT-PCR)				
		Fold change (treated vs control)	<i>p</i> ^c	<i>n</i> ^a	Fold change (treated vs control)	<i>p</i>	<i>n</i> ^b	Fold change (treated vs control)	<i>p</i>	<i>n</i> ^b		
											Control	Treated
<i>thra</i>	Thyroid hormone receptor alpha	3.54	4.5E-08	4	4.52	1.8E-06	22	17	2.37	0.0177	22	13
<i>opn1lw1</i>	Red-sensitive opsin-1	1055.38	6.9E-05	4	10.24	8.9E-05	26	17	2.11	0.0439	26	13
<i>si:ch211-5kl1.6</i>	Alpha globin (adult)	38.55	1.9E-05	4	79.86	1.5E-12	20	17	6.74	0.0009	20	12
<i>hbae3</i>	Hemoglobin alpha embryonic-3	0.10	4.4E-05	4	0.12	1.0E-08	26	17	3.30	0.0187	26	13
<i>cyp26a1</i>	Cytochrome P450, subfamily XXVIA, polypeptide 1	2.62	2.4E-04	4	3.07	2.3E-03	10	12	2.20	0.0021	5	5

^aNumber of spots, 3 biological replicates, 1 of them hybridized twice.

^bNumber of biological replicates, three technical replicates per sample and gene.

^cStudent's t-test.

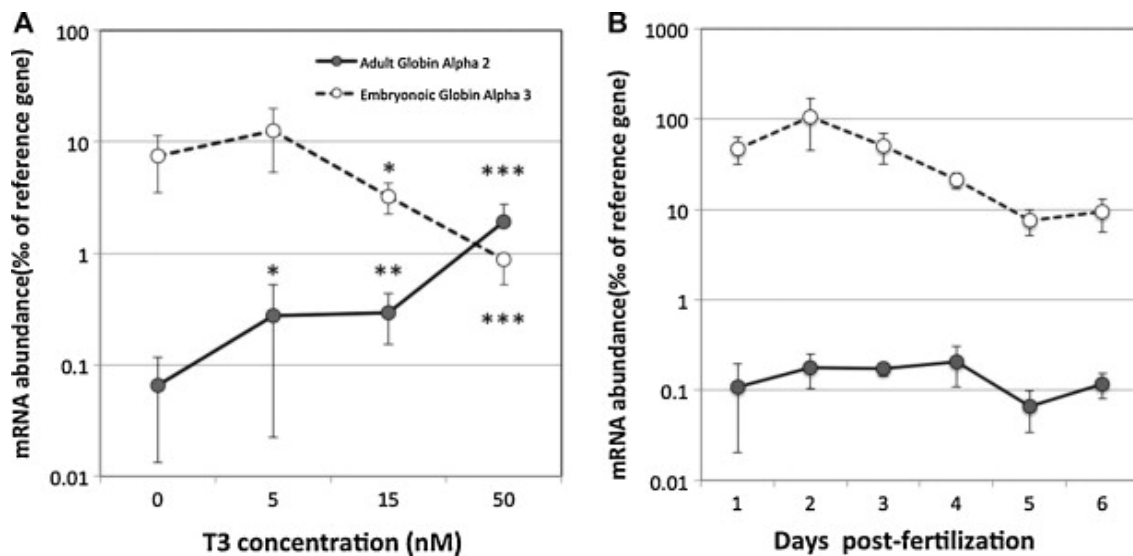


Fig. 3. (A) mRNA abundance levels (given in % of *ppia2* mRNA levels) for adult (*si:ch211-5k11.6*, solid circles) and embryonic (*hbae3*, empty circles) alpha globin transcripts from zebrafish eleutheroembryos treated with different concentrations of T3 (X-axis). Bars indicate SD values; asterisks indicate significance levels relative to non-treated control samples: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. (B) Evolution of the same transcripts during the first 6 days of zebrafish embryonic development, calculated and represented as above.

3.2 Effects of BPA on zebrafish thyroid system.

Treatment of zebrafish hatched eleutheroembryos with the proposed thyroid disrupter BPA at concentrations up to 4 mg/L (17.5 μ M, maximum tolerated concentration or MTC) resulted in an increase of alpha globin (*si:ch211-5k11.6*) and *cyp26a1* mRNA levels, whereas transcript abundance of *thra* and *opn1/w1* genes showed no significant variations (Table 2, Figure 4, left panel). No phenotypic alterations were observed in any of these treatments (not shown). Conversely BPA increased significantly the response to a low (5 nM) concentration of T3 (Figure 4, central panel) in a range of concentrations from 1 to 4 mg/L. This enhancement of thyroid response affected both the switch between embryonic and adult globins and the increase of the opsin *opn1/w1* gene transcript (Figure 4, central panel). The combination of 5 nM T3 and 2 or 4 mg/L BPA resulted in an expression pattern of all three genes essentially identical to the ones observed upon exposure to a saturating concentration of T3 (50 nM). Addition of BPA to this saturating T3 concentration did not modify significantly the mRNA abundance of any of the three genes (Figure 4, right panel). BPA showed no inhibitory effect on the response to T3 at any of the tested conditions, indicating that it is not acting as a T3 antagonist in this system (Figure 4). These data indicate that BPA acts both as weak agonist and as a potentiator of T3.

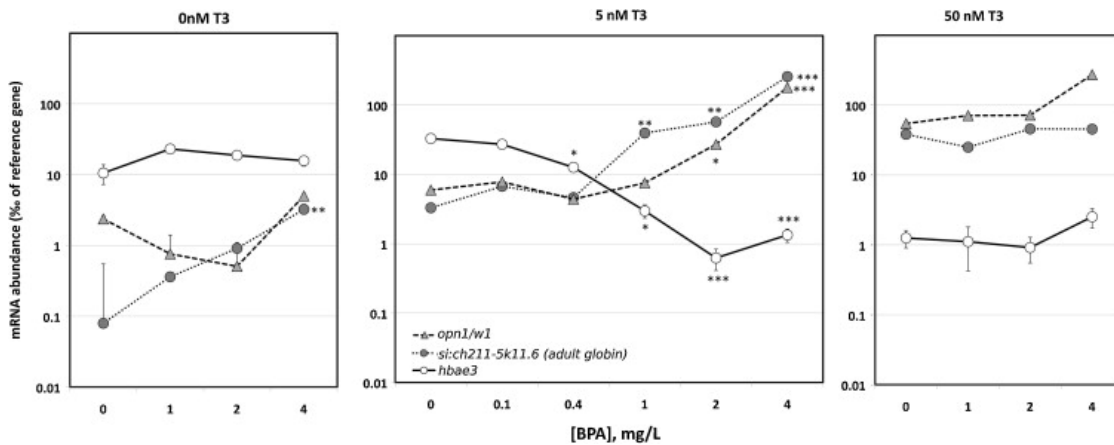


Fig. 4. Changes on mRNA abundance for adult (*si:ch211-5k11.6*, *adult globin*, grey circles) and embryonic (*hbae3*, empty circles) globin and long wavelength *opn1/w1* cone opsin (grey triangles) genes in zebrafish 5 dpf elutheroembryos after exposure with different concentrations of T3 and BPA. Data from at least 4 biological replicates for each point and gene (106 samples in total). Bars correspond to standard error of mean values. Asterisks indicate significant variations of a given data point relative to the control sample for the corresponding genes at each T3 concentration (i.e., the “0” values for each graph). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

3.3 Analysis of BPA effect in zebrafish elutheroembryos by TIQDT

Exposure of elutheroembryos to BPA at its MTC (17.5 μM) from 2 to 5 dpf had no a significant effect on the thyroid gland functionality compared to that of elutheroembryos exposed to 0.1% DMSO used as vehicle control, as judged by the immunofluorescence signal associated to the presence of T4 in the elutheroembryo thyroid follicles (Figure 5). In contrast, a similar exposure to 400 μM methimazole (MMI), a goitrogenic compound currently prescribed in human medicine to treat hyperthyroidism by inhibiting the thyroid peroxidase (TPO), resulted in a dramatic decrease of the T4-immunofluorescence in thyroid follicles (Figure 5). This result suggests that BPA action does not affect thyroid follicle functionality.

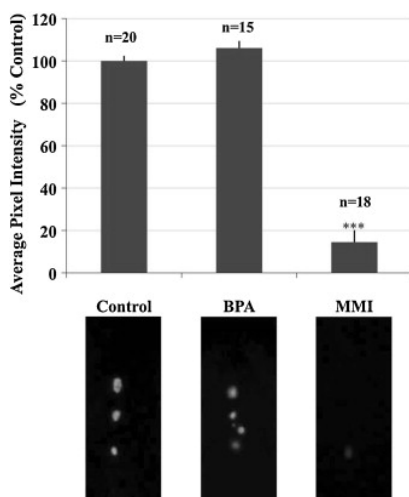


Fig. 5. TIQDT analysis of the effects of BPA and MMI. The top panel shows average pixel intensity of T4 immunofluorescence signals, expressed as percentage of the control values, corresponding to 5 dpf elutheroembryos previously treated for 3 days with 0.1% DMSO (vehicle control), 17.5 μM BPA, and 400 μM MMI (positive control). Images below each column correspond to representative images (ventral views with the anterior part at the top) for each treatment. The number of biological replicates for each treatment is indicated on top of the graph bar.

4. Discussion

Thyroid disruption is particularly difficult to analyze due the multiple mechanisms by which xenobiotics can impair thyroid gland and thyroid signaling systems (Crofton, 2008). Therefore, only holistic, multi-level approaches may cover all these possible mechanisms of action. One of these approaches are zebrafish embryos and eleutheroembryos, as they constitute a whole-organism model that includes all the main targets for thyroid disruption at a small scale (Raldúa et al, 2011). Endogenous TH starts to be synthesized and stored in thyroid follicles in the zebrafish eleutheroembryos (Brown, 1997; Raldúa and Babin, 2009), but there is no information about its biological availability. A recent study has estimated T3 and T4 concentrations in 75 hpf zebrafish eleutheroembryos to be approximately 0.8 and 2.6 pM, respectively (Walpita et al., 2009). However, TRs and some TH-regulated genes are already expressed and functional during zebrafish early development, although TH levels of maternal origin are supposed to be very low. Disruption of the thyroid gland during zebrafish development can be precisely monitored by detecting the presence or absence of T4 in the thyroid follicles, the molecular basis for TIQDT (Raldúa and Babin, 2009). The molecular markers developed in the present work complement this assay as they monitor the ability of thyroid disrupters to activate or repress transcription of T3-responsive genes in target tissues, an aspect of thyroid disruption in principle not covered by the TIQDT assay.

Exposure to T3 affected only a minor part, i.e. around 2%, of transcripts analyzed in our study. This relative small transcriptome effect was concentrated on transcripts of genes related to skeletal development, eye formation and hemoglobin variants, whereas other functional categories (embryonic development, respiration and energy achievement, cell proliferation, stress) appeared unaffected. We consider this as indicating that general toxicity effects (i.e., not associated to any specific mode of action) were kept at a minimum in our treatment scheme. The same functional classes of genes are known targets for TDCs during metamorphosis in amphibians, teleost fishes, and lampreys (Allison et al., 2006; Benbassat, 1974; Gan and Novales Flamarique, 2010; Opitz et al., 2005; Solbakken et al., 1999; Tata, 2006; Temple et al., 2008; Youson et al., 1997), an effect very similar to the one described here. Major postembryonic changes (some times described as metamorphosis) occur in zebrafish during the third and fourth weeks after

fertilization, including changes in sensory systems (including eyes) and the substitution of adult hemoglobin for embryonic forms (Brown, 1997; Parichy and Tumer, 2003). We therefore interpret the observed changes as a general advancement rather than to an inhibition of the development, consistent with specific, "adult" regulatory processes triggered by the ectopic administration of T3.

Human and environmental exposures to BPA are deemed to be significantly high, as it is one of the most produced chemicals in the world. The average daily exposure to BPA for humans has been calculated at around 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ body weight, whereas EPA estimates a reference dose of 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ body weight (Vandenberg et al., 2009). BPA levels in urban and industrial wastewaters may also exceed the $\mu\text{g}/\text{L}$ mark, with peak values around 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Musolff et al., 2009; Vethaak et al., 2005). In any case, these values are far below the non-observed effect concentration (NOEC, 1 mg/L, Fig. 4) in our experiments, which probably can only be reached by accidental spills. In any case, the health risk associated to environmental relevant exposure levels of BPA is still controversial. BPA is a known estrogen disruptor, binding to estrogen receptor with an affinity 10,000-fold weaker than that of estradiol, and some evidences exist for ecological impact associated to this estrogenic activity (Crain et al., 2007; Vandenberg et al., 2009). However, there are many evidences for an interaction of BPA with the thyroid system. BPA and its halogenated derivatives are known to bind to TR and to act as a TH antagonist both in two-hybrid mammalian assay (Moriyama et al., 2002) and in exposed laboratory animals, including mammals and amphibians (Crofton, 2008; Kitamura et al., 2002; Kitamura et al., 2005; Zoeller et al., 2005). Furthermore, BPA is reported to bind the 9-cis Retinoic Acid receptor RXR (Li et al., 2008), which in turn is able to heterodimerize with TR and to modulate its transcriptional activity in a ligand-dependent manner (Aranda and Pascual, 2001). Finally, BPA, as demonstrated for many xenobiotics, may alter the relative activity of hepatic enzymes, like deionidase or UDP-glucoronyl transferase, which are known to modulate T3/T4 serum levels and hence the thyroid hormone homeostasis (Kohrle, 2008; Wade et al., 2002). Our results showed evidence for a mild agonistic, rather than antagonistic, activity of BPA and no negative effects on thyroid gland function in zebrafish eleutheroembryos. BPA appeared as a strong potentiator of T3-dependent effects, increasing its effective concentration by one order of magnitude, in a strong cooperative effect. Whatever the precise mechanism may it be, the quantitative analysis of transcriptional effects of BPA and other pollutants

on TH-responsive genes in zebrafish eleutheroembryos appears as a promising procedure to assess their environmental and health risk, at moderate costs in temporal and monetary terms, and suitable to be used in high throughput screening schemes. Our data clearly illustrate the necessity to use *in vivo* models, as zebrafish, to correctly assess the goitrogenic and developmental hazards of the thousands of new chemicals introduced into the environment every year.

Conclusions

Exposure to T3 during the eleutheroembryonic stage induced only moderate changes on zebrafish transcriptome, affecting transcripts of genes taking part in only three important functions: skeleton development and ossification, eye development and the hematopoietic system. These effects can be interpreted as an advancement of the natural developmental pattern, by which genes normally expressed at the end of the larval stage (2 to 4 weeks post-fertilization) become expressed at a stage at which eleutheroembryos are not capable of autonomous feeding. This process can be monitored by analyzing transcript expression of selected genes, which constitute markers for thyroid function and thyroid disruption. By using these quantitative mRNA markers, we found that the suspected thyroid disruptor BPA can only partially mimic this effect. However, BPA constituted a strong potentiator of T3 at concentrations at which none of them induced transcriptional changes by themselves. As BPA did not act as a canonical goitrogen in zebrafish embryos, we concluded that BPA may affect thyroid response by a still unknown mechanism, a result that could have important implications from both environmental and public health point of view. We concluded that the analysis of expression of thyroid-responsive genes in zebrafish embryos, combined with TIQDT, provides an excellent model for studying thyroid disruption in an animal replacement test.

Acknowledgements

This work has been funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (CGL2008-01898). E.O. acknowledges a predoctoral fellowship from the Portuguese Fundação para a Ciência e Tecnologia (SFRH/BD/48244/2008.) B.T acknowledges a predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Science and Innovation (FPU-

grant AP2006-01324). The French Ministry of Research and Education and the Conseil Régional d'Aquitaine (200881301031/TOD project) supported work contributed by P.J.B

References

- Allison, W.T., Dann, S.G., Veldhoen, K.M., Hawryshyn, C.W., 2006. Degeneration and regeneration of ultraviolet cone photoreceptors during development in rainbow trout. *J Comp Neurol* 499, 702-715.
- Aranda, A., Pascual, A., 2001. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81, 1269-1304.
- Babin, P.J., Thisse, C., Durliat, M., Andre, M., Akimenko, M.A., Thisse, B., 1997. Both apolipoprotein E and A-I genes are present in a nonmammalian vertebrate and are highly expressed during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8622- 8627.
- Belanger, S.E., Balon, E.K., Rawlings, J.M., 2010. Saltatory ontogeny of fishes and sensitive early life stages for ecotoxicology tests. *Aquat Toxicol* 97, 88-95.
- Benbassat, J., 1974. The transition from tadpole to frog haemoglobin during natural amphibian metamorphosis. I. Protein synthesis by peripheral blood cells in vitro. *J Cell Sci* 15, 347-357.
- Berghmans, S., Butler, P., Goldsmith, P., Waldron, G., Gardner, I., Golder, Z., Richards, F.M., Kimber, G., Roach, A., Alderton, W., Fleming, A., 2008. Zebrafish based assays for the assessment of cardiac, visual and gut function--potential safety screens for early drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods* 58, 59-68.
- Brent, G.A., 2007. Diagnosing thyroid dysfunction in pregnant women: Is case finding enough? *J Clin Endocrinol Metab* 92, 39-41.
- Brent, G.A., Braverman, L.E., Zoeller, R.T., 2007. Thyroid health and the environment. *Thyroid* 17, 807-809.
- Brouwer, A., Morse, D.C., Lans, M.C., Schuur, A.G., Murk, A.J., Klasson-Wehler, E., Bergman, A., Visser, T.J., 1998. Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicol Ind Health* 14, 59-84.
- Brown, D.D., 1997. The role of thyroid hormone in zebrafish and axolotl development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 13011-13016.

-
- Crain, D.A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G.A., Guillette Jr, L.J., 2007. An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reprod Toxicol* 24, 225-239.
 - Crofton, K.M., 2008. Thyroid disrupting chemicals: mechanisms and mixtures. *Int J Androl* 31, 209-223.
 - EC, 2010. Directive on the protection of animals used for scientific purposes, in: Communities, C.o.t.E. (Ed.), Directive 2010/63/EU, Brussels, Belgium.
 - Embry, M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T.A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Leonard, M.A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., Whale, G., 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat Toxicol* 97, 79-87.
 - Gan, K.J., Novales Flamarique, I., 2010. Thyroid hormone accelerates opsin expresión during early photoreceptor differentiation and induces opsin switching in differentiated TRalpha-expressing cones of the salmonid retina. *Dev Dyn* 239, 2700-2713.
 - Golub, M.S., Wu, K.L., Kaufman, F.L., Li, L.H., Moran-Messen, F., Zeise, L., Alexeeff, G.V., Donald, J.M., 2010. Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposure. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 89, 441-466.
 - Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253-310.
 - Kitamura, S., Jinno, N., Ohta, S., Kuroki, H., Fujimoto, N., 2002. Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 554-559.
 - Kitamura, S., Kato, T., Iida, M., Jinno, N., Suzuki, T., Ohta, S., Fujimoto, N., Hanada, H., Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., 2005. Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. *Life Sci* 76, 1589-1601.
 - Kohrle, J., 2008. Environment and endocrinology: The case of thyroidology. *Ann Endocrinol.* 69, 116-122.
 - Li, J., Ma, M., Wang, Z., 2008. A two-hybrid yeast assay to quantify the effects of xenobiotics on retinoid X receptor-mediated gene expression. *Toxicol Lett* 176, 198-206.

-
- Melzer, D., Rice, N.E., Lewis, C., Henley, W.E., Galloway, T.S., 2010. Association of Urinary Bisphenol A Concentration with Heart Disease: Evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One* 5.
 - Morais, S., Knoll-Gellida, A., Andre, M., Barthe, C., Babin, P.J., 2007. Conserved expression of alternative splicing variants of peroxisomal acyl-CoA oxidase 1 in vertebrates and developmental and nutritional regulation in fish. *Physiol Genomics* 28, 239-252.
 - Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., Nakao, K., 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 5185-5190.
 - Musolff, A., Leschik, S., Moeder, M., Strauch, G., Reinstorf, F., Schirmer, M., 2009. Temporal and spatial patterns of micropollutants in urban receiving waters. *Environ Poll* 157, 3069-3077. OECD, 2006. Detailed Review Paper on Thyroid Hormone Disruption Assays, OECD Series on Testing and Assessment. OECD, Paris.
 - Opitz, R., Braunbeck, T., Bogi, C., Pickford, D.B., Nentwig, G., Oehlmann, J., Tooi, O., Lutz, I., Kloas, W., 2005. Description and initial evaluation of a *Xenopus* metamorphosis assay for detection of thyroid system-disrupting activities of environmental compounds. *Environ Toxicol Chem* 24, 653-664.
 - Owens, J., 2007. Report of Three 21-day Fish Endocrine Screening Assays To Complete CEFIC's Contribution to Phase-2 of the OECD Validation Program: Studies with Potassium Permanganate, n-Octanol, and 2-Methoxyethanol in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*), IBACON laboratory study reports. Environmental Sciences- The Procter & Gamble Company Cincinnati, OH.
 - Parichy, D.M., Tumer, J.M., 2003. Zebrafish puma mutant decouples pigment pattern and somatic metamorphosis. *Devel Biol* 256, 242-257.
 - Pfaffl, M., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucl Acids Res* 29, e45.
 - Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucl Acids Res* 30, e36.
 - Raldúa, D., Babin, P.J., 2009. Simple, Rapid Zebrafish Larva Bioassay for Assessing the Potential of Chemical Pollutants and Drugs to Disrupt Thyroid Gland Function. *Environ Sci Technol* 43, 6844-6850.

-
- Raldúa D., Thienpont B., Babin P.J., 2011. Zebrafish eleutheroembryos as an alternative system for screening chemicals disrupting the mammalian thyroid gland morphogenesis and function. *Reprod Toxicol*, doi:10.1016/j.reprotox.2011.09.001
 - Strähle U, Schloz S, Geisler R, Greiner P, Hollert H, Rastegar S, et al. 2011. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments – A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod Toxicol*, doi:10.1016/j.reprotox.2011.06.121.
 - Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., Quackenbush, J., 2003. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34, 374-378.
 - Schmutzler, C., Gotthardt, I., Hofmann, P.J., Radovic, B., Kovacs, G., Stemmler, L., Nobis, I., Bacinski, A., Mentrup, B., Ambrugger, P., Gruters, A., Malendowicz, L.K., Christoffel, J., Jarry, H., Seidlova-Wuttke, D., Wuttke, W., Kohrle, J., 2007. Endocrine disruptors and the thyroid gland--a combined in vitro and in vivo analysis of potential new biomarkers. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1, 77-83.
 - Scholz, S., Mayer, I., 2008. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Mol Cell Endocrinol* 293, 57-70.
 - Solbakken, J.S., Norberg, B., Watanabe, K., Pittman, K., 1999. Thyroxine as a mediator of metamorphosis of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Environ Biol Fishes* 56, 53-65.
 - Stegeman, J.J., Goldstone, J.V., Hahn, E., 2010. Perspectives on zebrafish as a model in environmental toxicology, in: SF Perry, AP Farrell, CJ. Brauner (Eds.), *Fish Physiology Vol 28*. Academic Press, pp. 367-439.
 - Takser, L., Mergler, D., Baldwin, M., de Grosbois, S., Smargiassi, A., Lafond, J., 2005. Thyroid hormones in pregnancy in relation to environmental exposure to organochlorine compounds and mercury. *Environ Health Perspect* 113, 1039-1045.
 - Tata, J.R., 2006. Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* 246, 10-20.
 - Temple, S.E., Ramsden, S.D., Haimberger, T.J., Veldhoen, K.M., Veldhoen, N.J., Carter, N.L., Roth, W.M., Hawryshyn, C.W., 2008. Effects of exogenous thyroid hormones on visual pigment composition in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J Exp Biol* 211, 2134-2143.

-
- Thienpont, B., Tingaud-Sequeira, A., Prats, E., Barata, C., Babin P.J., Raldúa, D., 2011. Zebrafish eleutheroembryos provide a suitable vertebrate model for screening chemicals that impair thyroid hormone synthesis. *Environ Sci Technol*, 45, 7525– 7532
 - Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., Soto, A.M., 2009. Bisphenol- A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 30, 75-95.
 - Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C.M., Kuiper, R.V., Legler, J., Murk, T.A.J., Peijnenburg, W., Verhaar, H.J.M., de Voogt, P., 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* 59, 511-524.
 - Wade, M.G., Parent, S., Finnson, K.W., Foster, W., Younglai, E., McMahon, A., Cyr, D.G., Hughes, C., 2002. Thyroid toxicity due to subchronic exposure to a complex mixture of 16 organochlorines, lead, and cadmium. *Toxicol Sci* 67, 207-218.
 - Walpita, C.N., Crawford, A.D., Janssens, E.D.R., Van der Geyten, S., Darras, V.M., 2009. Type 2 Iodothyronine Deiodinase Is Essential for Thyroid Hormone-Dependent Embryonic Development and Pigmentation in Zebrafish. *Endocrinology* 150, 530-539.
 - Youson, J.H., Manzon, R.G., Peck, B.J., Holmes, J.A., 1997. Effects of exogenous thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) on spontaneous metamorphosis and serum T4 and T3 levels in immediately premetamorphic sea lampreys, *Petromyzon marinus*. *J Exp Zool* 279, 145-155.
 - Zoeller, R.T., 2005. Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: New studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals? *Mol Cell Endocrinol* 242, 10-15.
 - Zoeller, R.T., Bansal, R., Parris, C., 2005. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146, 607-612.

6.DISCUSSIÓ GLOBAL

En els últims anys i sobretot a partir de la Revolució Industrial els efectes de l'acció dels éssers humans sobre el medi ambient ha adquirit una gran importància. En gran part, els avenços tecnològics han anat acompanyats d'un augment del nombre de substàncies abocades al medi, moltes d'elles amb efectes negatius sobre la seva fauna i flora. Durant molt de temps aquests efectes no generaven preocupació social i els seus efectes passaven inadvertits. Tanmateix, això va començar a canviar a partir de la darrera dècada del segle XX, quan van començar a aparèixer les primeres regulacions sobre la indústria fonamentades principalment per estudis químics. Actualment ens trobem en el marc d'una societat progressivament més exigent amb la qualitat de l'entorn, motiu pel qual apareixen diàriament noves metodologies que complementen i reforcen les tècniques clàssiques.

Un dels efectes del desenvolupament industrial i més concretament de la sofisticació de la indústria química ha estat l'aparició de contaminants capaços de produir els seus efectes tòxics mitjançant la seva interacció amb dianes moleculars molt específiques, com són els receptors nuclears. Aquest mecanisme de toxicitat fa que alguns contaminants tinguin efectes metabòlics rellevants a concentracions molt baixes, de l'orde de micrograms o fins i tot nanograms per litre. Són els anomenats microcontaminants, i el seu control representa un doble repte. Per un lloc, requereixen el desenvolupament de tècniques analítiques d'alta sensibilitat i precisió, capaces de detectar concentracions de ppbs o ppts de molècules orgàniques complexes (Diaz-Cruz, Lopez de Alda et al. 2003; Gros, Petrovic et al. 2006). Per l'altra, és necessari desenvolupar bioassaigs capaços de monitoritzar els efectes específics d'aquestes substàncies a concentracions ambientalment rellevants. Aquesta tesi ha desenvolupat alguns d'aquests assaigs per detectar efectes de microcontaminants sobre sistemes propis de vertebrats i que constitueixen una amenaça latent tant pels ecosistemes com per les poblacions humanes. Per tal efecte s'han utilitzat biomarcadors gènics en diversos animals sentinelles, tant procedents de llocs sospitosos de patir contaminació com en animals establats, el que ha permès l'avaluació mediambiental de determinats ecosistemes i el disseny de nous biomarcadors per a la detecció de microcontaminants, com és el cas dels disruptors tiroïdals.

Capítol 1. Estandardització i aplicació del bioassaig per testar mostres d'origen ambiental per tal d'estudiar el seu impacte en quant a compostos tipus dioxina a les zones de mostreig

6.1 Estudi de l'impacte ambiental per activitat tipus dioxina a l'embassament de Flix i part baixa del riu Ebre.

6.1.1. Expressió de Cyp1a en *Cyprinus carpio* per a la detecció de compostos organoclorats a l'embassament de Flix.

Els mètodes d'anàlisi clàssics per a la monitorització ambiental estan basats en anàlisis químiques, bioassaigs de toxicitat general en animals, observació d'efectes directes, etc. De forma general aquests mètodes tenen un elevat



cost, una metodologia costosa i en alguns casos temps d'observació molt elevats. La utilització de biomarcadors d'expressió per a la monitorització ambiental presenta una sèrie d'avantatges respecte aquests assaigs: disminució del cost, augment de la sensibilitat respecte algunes metodologies clàssiques, augment de la capacitat per detectar abocaments puntals, possibilitat d'observar i estudiar l'impacte generat per als contaminants a la biota autòctona, etc. A més, en el nostre cas concret on s'ha estudiat els efectes dels compostos *dioxin like*, les metodologies clàssiques no són del tot adients ja que poden infravalorar els seus efectes degut a que els assaigs utilitzats solen utilitzar Dàfnia (crustaci) o Clorofícies (algues unicel·lulars), que no disposen del mecanisme d'activació de l'AhR propi dels vertebrats, part essencial del mecanisme de toxicitat d'aquests compostos. El receptor d'Hidrocarburs d'Aril (AhR) actua com regulador d'expressió d'un gran nombre de gens, entre ells el Cyp1a, principal responsable del metabolisme de xenobiòtics. Existeixen un gran nombre de contaminants ambientals capaços d'unir-se al AhR i induir la seva activació ectòpica. A més, aquests es troben àmpliament distribuïts per tota la biosfera. El nostre estudi es basa en la capacitat d'alguns contaminants a induir l'activació de AhR que comporta un augment en l'expressió de Cyp1a que serà el nostre gen seleccionat com a biomarcador d'expressió per tal d'estudiar l'impacte d'una planta de processament de clor situada al tram baix del riu Ebre.

El centre d'aquest estudi es situa a l'embassament de Flix on, des de principis del segle XX, opera una indústria química de producció de compostos clorats que ha estat abocant els seus residus al riu dintre dels marges legals de cada època. A més, a principis dels anys 50, es va construir la presa de Flix tan sols uns metres més avall de la principal zona d'abocament dels residus, el qual ha provocat que aquests hagin anat sedimentant a la llera dreta del riu formant un delta artificial clarament visible format per unes 20.000-36.000 tones de sediments, de les quals 1-10 corresponen a compostos organoclorats i 10-70 a metalls pesants (Grimalt, 2003).

Per tal d'estudiar l'activitat tipus dioxina d'aquests residus i el seu impacte sobre la biota autòctona, així com el seu possible transport aigües avall, es van mostrejar diversos individus de *Cyprinus carpio* des d'aigües amunt, al pantà de Riba-Roja, que compta amb un ecosistema saludable, a l'embassament de Flix, a la zona d'Ascó, Xerta i a l'embassament de Boadella situat a la demarcació de Girona. Tots els individus van ser mesurats, sexats i pesats avanç de ser sacrificats per tal d'obtenir mostres de fetge i escates.

S'han realitzat tot els protocols previs per tal de validar el correcte funcionament dels encebadors per Cyp1a, la seqüència dels quals prové d'estudis en *Cyprinus carpio* publicats anteriorment (Quiros, Raldua et al. 2007). Les anàlisis estadístiques han definit dos grups ben diferenciats en els dos teixits diana tot i que amb un patró d'expressió diferent entre els punts de mostreig (Tamhane, $p < 0.05$). Les escates dels peixos mostrejats a la zona de Flix han presentat un augment en l'expressió de Cyp1a respecte els individus mostrejats al llarg al llarg del curs del riu Ebre. Al comparar individualment les mostres d'Ascó i Xerta respecte els nostres controls negatius (Boadella i Riba roja), aquestes han presentat un augment en l'expressió de Cyp1a de forma significativa. Per contra, les mostres on el teixit diana ha estat el fetge han mostrat una màxima activitat en els individus capturats en el meandre d'Ascó (Figura 37).

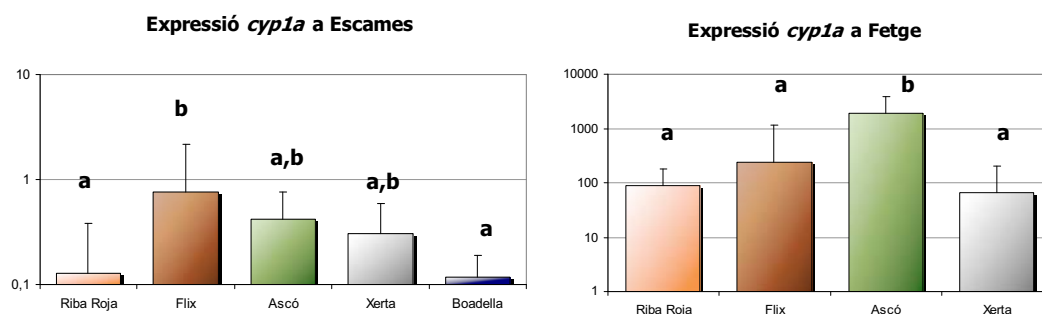


Figura 37. Expressió de *cyp1a* (Expressat com a %₀₀ respecte el gen de referència) a escames i fetge de *Cyprinus Carpio* en diferents punts del tram baix de la conca del riu Ebre. Les lletres indiquen els diferents grups definits pel test de Tamhane ($p > 0,05$) amb variàncies no homogènies.

La relació directa entre la presència de determinats contaminants i l'expressió de *Cyp1a* als vertebrats ha estat àmpliament demostrada en diversos sistemes, per tant aquest patró d'expressió reflecteix un augment en la presència de contaminants tipus *dioxin like* provinents de la fàbrica de Flix. Com es pot observar, el patró d'expressió depèn del teixit diana analitzat. Al ser un òrgan intern, el fetge rep el tòxic via sanguínia, mentre que les escames presenten un contacte directe amb el contaminant. No disposem de dades suficients per poder afirmar quin és la principal via d'exposició, encara que el fet que les escames de *Carassius auratus* responguin més ràpidament que el fetge a la presència de lligands de l'AhR a l'aigua (Quiros, Raldua et al. 2007)) fa pensar que el contacte directe pugui tenir al menys un paper significatiu. *Cyprinus carpio* tendeix a desplaçar-se de forma constant aigües amunt i avall, és possible que la contaminació rebuda per la ingesta (i que afectaria sobretot al fetge) sigui menor que la rebuda per contacte directe amb l'aigua (que afectaria sobretot a les escames). La dilució aigües avall d'ambdós efectes està segurament relacionada amb la deposició dels contaminants als llocs del riu, fora de la xarxa tròfica, cosa que aparentment no passa amb altres contaminants, com el mercuri (Olivares, 2010). Emperò, i donada la gran persistència dels compostos organoclorats, aquests contaminants emmagatzemats podrien remobilitzar-se i presentar un nou factor de risc per la població animal i humana de tot el baix Ebre.

Per tant, podem concloure que els fangs dipositats per l'empresa de processament de materials clorats no tenen una única acció localitzada a l'estany de Flix i que aquests són una contribució constant de contaminants al tram inferior del riu Ebre. A més, les diferències en el patró d'expressió de forma dependent al teixit analitzat han posat de manifest la major rapidesa de resposta de les escames vers el fetge, el que ha indicat una possible acció per contacte directe del tòxic sobre les primeres.

6.1.2 Estudi dels contaminants organoclorats de la zona de Flix sobre *Ardea purpurea* i els seus efectes genotòxics:

El nostre grup ha trobat indicis de biomagnificació en la xarxa tròfica provocats per determinats contaminants abocats per la fabrica de Flix. Per això, en el present treball s'ha estudiat aquest possible efecte de biomagnificació dels contaminants amb capacitat genotòxica presents a la zona de Flix i al llarg del tram baix del riu Ebre.

El nostre estudi es basa en el recompte de micronuclis presents en la sang extreta de polls d'*Ardea purpurea*. Els Ardeids i altres aus piscívores són organismes indicadors apropiats de la contaminació ambiental d'aigua dolça, ja que pertanyen als nivells més alts de la xarxa tròfica d'aquests ecosistemes i poden bioacumular fins a 1000 vegades determinats contaminants de caràcter lipofílic (Bro-Rasmussen 1996). Existeixen un gran nombre de publicacions que han utilitzat diferents espècies de la família dels Ardeids com a bioindicador ambiental (De Luca-Abbott, Wong et al. 2001; Barata, Fabregat et al. 2010; Cotin, Garcia-Tarrason et al. 2012). A més, la utilització de polls presenta diversos avantatges: Eliminació dels efectes de bioacumulació, fàcil determinació de l'edat i per tant del temps d'exposició als contaminants i finalment l'acotació de la zona a estudiar ja que l'agró roig alimenta els seus polls mitjançant la recol·lecció de presses en una zona de 2-3 Km al voltant del niu.

Les mostres van ser recollides en diferents zones del tram baix del riu Ebre durant la temporada de reproducció i construcció de nius. Les mostres de sang es recullen dels polls provinents de tres colònies situades en tres zones ben diferenciades de la Conca del riu Ebre. La primera es situa a Aiguabarreig, zona sense informes previs de contaminació i sense un gran impacte antropològic. La segona es situa a Flix, on s'hi ha generat un gran impacte ambiental i la tercera es situa al Delta de L'Ebre, localització que presenta una gran concentració agrícola i la seva

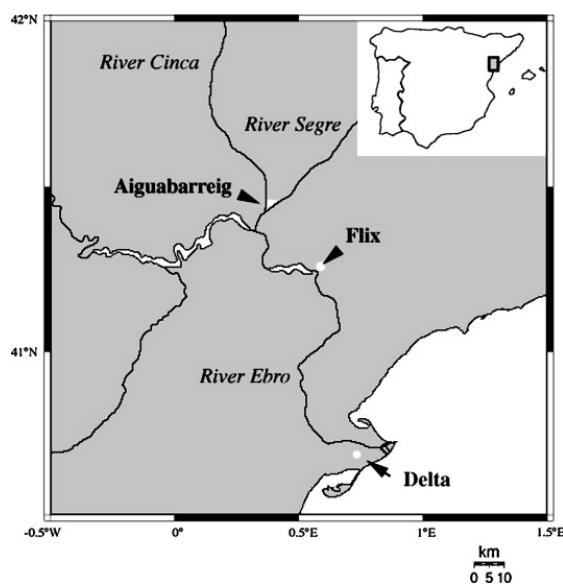


Fig.ura 38 Punts de Mostreig dels polls *d'Ardea purpurea* (Indicats amb fletxes) a la conca del riu Ebre.

conseqüent contaminació associada a zones altament cultivades, així com aquella que prové del propi riu Ebre acumulada al llarg del seu recorregut.

Tots els individus mostrejats van ser sexats, mesurats i pesats. Les anàlisis estadístiques han demostrat que les tres poblacions no presenten diferències fisiològiques significatives, el que ha determinat que les possibles diferències en el recompte de micronuclis no és un producte de les diferències fisiològiques entre les tres poblacions.

El recompte de micronuclis es realitza habitualment pel comptatge de centenars o milers de cèl·lules pel microscopi. En el nostre cas s'ha optat quantificar els micronuclis mitjançant l'ús de tècniques de citometria de flux. Aquesta tècnica va ser descrita originàriament per Nüsse (*Secció 1.5.4*) i permet augmentar la sensibilitat, la reproductivitat i el rendiment de l'estudi.

Seguint el protocol proposat per Nüsse, prèviament s'han centrifugat les mostres sanguínies i s'han resuspès els eritròcits a una concentració de 106 cèl·lules/50µl amb tampó citrat 0.1M (29.41g de $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ en 1000ml d'aigua MiliQ). Per tal de no alterar els resultats totes les mostres són processades i analitzades en menys de 24 hores.

En el següent gràfic podem observar els resultats obtinguts:

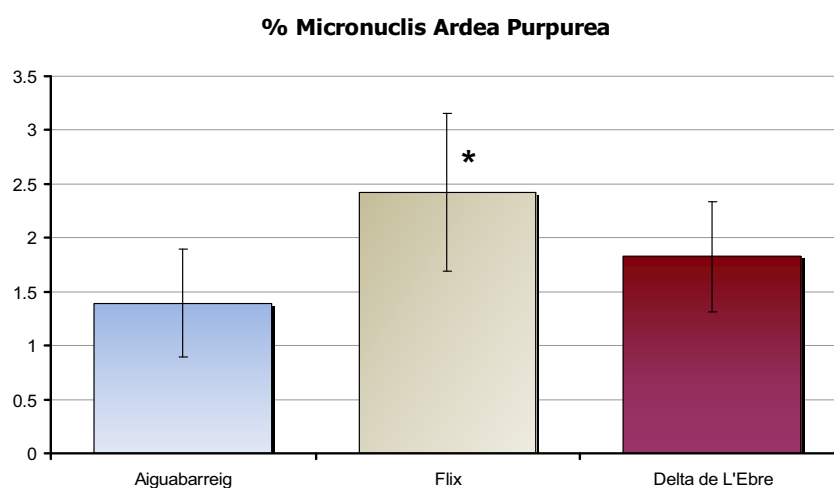


Figura 39. Presència de MN a eritròcits perifèrics a *Ardea Purpurea*. Els asteriscs indiquen les poblacions que presenten diferències significatives respecte el individu control capturats a Aiguabarreig (ANOVA * $p > 0,05$)

Els valors s'han ajustat a una distribució normal (Kolmogorov-Smirnov, $p > 0.05$) i per tant s'han realitzat proves paramètriques per comparar les diverses poblacions amb les quals s'han trobat diferències significatives entre les tres poblacions (ANOVA, $p > 0.05$). Les mostres de sang extretes dels polls de la zona de Flix han presentat un augment significatiu en la freqüència de micronuclis presents en els eritròcits perifèrics respecte a les altres dues poblacions. Per tant, podem concloure que a la zona de Flix existeixen contaminants amb capacitat genotòxica que provoquen un augment del nombre de micronuclis en la sang dels polls. L'impacte que pateixen les aus degut a la presència d'aquests contaminants encara està per determinar, però es preveu que, tot i que no sigui menyspreable, es tracta d'un impacte moderat. Aquests resultats coincideixen amb els estudis realitzats anteriorment, tant en aus com en peixos, que indiquen presència de contaminants genotòxics en la zona de Flix (Quiros, Raldua et al. 2007; Quiros, Ruiz et al. 2008).

Paral·lelament als nostres estudis utilitzant micronuclis, es van realitzar anàlisis de les plomes i ous per tal de valorar la presència de metalls pesants i compostos organoclorats en *A. purpurea* i *E. garzetta*, també de la família dels Ardeids, per part del grup investigador de C. Barata (Barata, Fabregat et al. 2010). Aquestes anàlisis han determinat una elevada presència de Hg, HCB i PCB en les aus amb nius als voltants del pantà de Flix. A la vegada, es van realitzar test de micronuclis a eritròcits perifèrics de *Cyprinus carpio* capturats al llarg de la Conca del riu Ebre en els mateixos punts on es va analitzar amb anterioritat el biomarcador d'expressió gènica *Cyp1a* (Secció 6.1.1). La lectura del test de micronuclis en peixos ha demostrat un augment de la seva presència en els individus de la zona de Flix i Ascó en comparació als individus capturats a Riba-roja, Boadella i Xerta que no han mostrat diferències en el recompte de micronuclis (Dades no mostrades). Aquests dos estudis reforcen els nostres resultats que han mostrat un índex de compostos genotòxics significativament inferiors a les zones d'Aiguabarreig i del Delta de l'Ebre als de Flix.

El conjunt de les dades analitzades han suggerit que existeix una bioacumulació i biomagnificació d'aquests tipus de contaminants en la cadena tròfica, no només en compostos organoclorats amb efectes citotòxics, sinó també amb la transferència de metalls pesats (Barata, Fabregat et al. 2010). Tot ells indiquen que hi ha un índex de

contaminació menor en les zones situades aigües a dalt i avall de Flix, senyalant aquest punt com a una font de productes tòxics amb la capacitat de produir un impacte en la fauna del medi.

Degut a l'etologia de *Ardea purpurea*, es creu que la via de transmissió de contaminants fins a la zona més alta de la cadena tròfica és mitjançant l'alimentació. L'única forma que els polls d'*Ardea purpurea* es vegin afectats per aquesta contaminació és mitjançant la dieta, ja que el contacte dels polls amb l'aigua o el sòl contaminat és nul·la o mínima perquè els nius són sempre situats en zones elevades, a més la dieta dels polls es fonamenta amb exclusivitat de peixos i amb una petita proporció d'insectes. Com s'ha pogut observar en la secció anterior, els peixos capturats a la zona de Flix i Ascó presenten un augment en l'expressió de Cyp1a i per tant estan impactats per la presència de compostos organoclorats. Degut a les seves característiques moleculars, aquests compostos tenen una gran capacitat de bioacumulació i per tant de transferir-se al llarg de la xarxa tròfica. A la vegada, la seva capacitat per augmentar l'expressió de Cyp1a els converteixen en uns bons candidats per a produir danys al DNA al llarg del temps. Durant els processos de detoxificació de molts compostos, on hi participa l'enzim citocrom P450, es poden crear metabòlits molt reactius i per tant potencialment genotòxics (Baird, Hooven et al. 2005). D'aquesta forma podem establir una relació directa entre la presència de compostos organoclorats a la zona de Flix i l'augment en el recompte de micronuclis en els polls d'*Ardea purpurea* mitjançant la captació de contaminants organoclorats amb la dieta.

En conclusió, les anàlisis dels diferents biomarcadors gènics en peixos i aus han identificat la zona de Flix, Ascó i Xerta com àrees d'impacte per la presència de contaminants tipus *dioxin like* i amb capacitat genotòxica, deixant patent la capacitat d'aquestes metodologies per l'avaluació ambiental. La correlació entre la presència de compostos organoclorats a l'embassament de Flix, l'expressió de Cyp1a en peixos i la presència de micronuclis en aus ha demostrat la capacitat dels compostos presents en els fangs de Flix de bioacumular-se produint un impacte en organismes situats en el punt més alt de la xarxa tròfica. Finalment, ha quedat demostrada la capacitat dels contaminants disposats en els fangs de desplaçar-se aigües avall de riu. De fet, tot i que en el present estudi només s'ha estudiat la comunitat d'aus de Flix, Aiguabarreig i el Delta de l'Ebre, les dades obtingudes amb la mesura d'expressió del Cyp1a en peixos

deixa de manifest que la fauna piscívora de les àrees d'Ascó i Xerta podria patir els mateixos efectes genotòxics que les aus de Flix.

6.2 Assaig en escames de peix zebra per a la monitorització de l'activitat dioxina en aigües superficials (Article 1).

6.2.1 Validació i estandardització de bioassaigs no letals basats en *Danio rerio* per la detecció de Compostos amb Activitat Dioxina, Metalls Pesants, Disruptors endocrins.

Les metodologies per al diagnòstic ambiental tenen que ser eficients i sensibles a l'impacte que produeix la contaminació al medi objectiu del nostre estudi. Després de realitzar els estudis a la Conca del riu Ebre, ens vàrem proposar desenvolupar una metodologia ràpida, no letal, fàcilment reproducible i que permeti una monitorització continuada en el temps. Aquesta metodologia permet la detecció de l'impacte ambiental mitjançant la utilització de biomarcadors gènics però reduint el màxim possible la inversió de temps de mostreig i evitant la mort de l'individu analitzat.

Danio rerio es presenta com un candidat ideal per complir aquests requisits. El seu manteniment és senzill i els protocols d'exposició proposats (*Secció 3.4*) permeten obtenir entre 8 i 10 replicats biològics mantenint els nostres individus únicament amb 5 litres d'aigua tractada. Existeixen diversos teixits diana que permeten realitzar estudis basats en biomarcadors d'expressió gènica (fetge, ronyo, gònades, etc.), però la utilització d'escames permet evitar la mort de l'animal donant al bioassaig la possibilitat de realitzar el seguiment d'un mateix individu al llarg d'un període de temps determinat. S'ha de remarcar que, a part dels estudis realitzats a la Conca del riu Ebre, el nostre grup ha demostrat la idoneïtat de la utilització d'escames de *Carassius auratus* i *Cyprinus carpio* com a teixit diana per la detecció ambiental per mitja de biomarcadors gènics (Quiros, Raldua et al. 2007; Navarro, Quiros et al. 2009).

Tot i que la bibliografia i els protocols establerts utilitzant *Danio rerio* com a animal model és extensa, fins al present treball mai s'havien utilitzat les seves escames com a teixit diana pel seu posterior anàlisi mitjançant qRT-PCR. Per això s'ha testat la viabilitat de la metodologia proposada amb una sèrie d'extraccions per comprovar la quantitat de RNA respecte la supervivència dels individus. S'han extret diverses

quantitats d'escames a diferents individus. Prèviament els individus han estat anestesiats per evitar el seu patiment i facilitar l'extracció. El protocol menys lesiu va ser l'extracció de tres escames dorsals, que no provocà danys irreversibles en la majoria dels casos (Taula 9.)

Taula 9. Quantitat de RNA vers la supervivència dels individus

Mostra	Nombre d'escames Extremitats	Sexe	[RNA] (ng/μl)
P1	Totes les escames	Mascle	146.2
P2	Totes les escames	Mascle	47.04
P3A	3 Escames Dorsals	Mascle	89.66
P3B	Escames d'un Costat	Mascle	8.53
P2-1A	3 Escames Dorsals	Mascle	46.79
P2-1B	3 Escames Caudals	Femella	71.60
P2-2A	3 Escames Dorsals + Caudals	Mascle	66.25
P2-3B	3 Escames Dorsals + Caudals	Femella	19.59

L'electroforesi microfluídica (Bioanalyzer 2100, Agilent) ha permès comprovar la qualitat del mRNA extret amb uns valors RIN (RNA Integrity Number) propers a 9 en totes les mostres. Aquests resultats han posat de manifest que l'extracció de 3 escames per animal minimitza al màxim el patiment, permet viabilitat dels animals tractats i possibilita l'extracció de la suficient quantitat de mRNA per no comprometre l'estudi, sempre i quan es procedeixi a una amplificació del cDNA obtingut mitjançant la utilització del kit d'amplificació CellAmp™ Whole Transcriptome Amplification Kit (Takara, Japó).

L'elecció dels biomarcadors d'exposició indicats per l'estudi s'han realitzat en base a la seva capacitat de respondre als contaminants presents al medi. Aquests marcadors es van testar amb mostres d'aigua del riu Llobregat, que pateix un gran impacte ambiental antropogènic i industrial degut a l'activitat minera de Súria i les indústries presents a Terrassa, Rubí o Martorell, entre d'altres. A partir d'estudis previs (Fernandez, Alonso et al. 1999; Damásio J 2008; Brix, Postigo et al. 2010) s'ha conclòs que els xenobiòtics tipus dioxina, els metalls pesants i els disruptors endocrins són els contaminants amb més alta probabilitat de ser-hi presents. La bibliografia sobre aquests compostos és extensa, tots ells presenten una interacció amb la biota aquàtica i una gran capacitat d'actuar com a lligands específics per determinats receptors moleculars activant o desactivant diferents cascades de reaccions cel·lulars. S'han dissenyat i testat encebadors pels productes gènics de *mt1*, *mt2*, *cyp1a*, *esr1*, *efl* i *ppia2* (Taula 10).

Taula 10 Encebadors Seleccionats per l'anàlisi

Encebador	Accesion number	Producte	Seqüència (5'-3')
<i>mt1</i>	X97278	Metal·lotioneïna I	CTGCGAATGTGCCAAGACT GCTGGAGCCACAGGAAT
<i>mt2</i>	BX908765	Metal·lotioneïna II	CTCCTGGAAAAATGGACCCCTG ATTTAGACAAAGGACATGGCAG
<i>cyp1a</i>	AB078927	Citocrom p450 1a	GGTTAAAGTTCACCGGGATGC CTGTGGTGTGACCCGAAGAAG
<i>esr1</i>	AF349412	Receptor estrogens α	CCACATGCGGATGATGATGAGG ACAAGTTGCCGTTGGACTGA
<i>efl</i>	X77689	ETS-related transcriptor factor-1	CGTCTGCCACTTCAGGATGTG ACTTGCAGGCGATGTGAGCAG
<i>ppia2</i>	AY391452	Peptidil prolil cis-trans isomerasa A	GGGTGGTAATGGAGCTGAGA AATGGACTTGCCACCAGTTC

L'expressió de *mt1* i *mt2* permet monitoritzar la presència de metalls com el Zn, Cd, Hg, Cu, Pb Ag i Vi els quals provoquen l'activació directa o indirecta del factor de transcripció MTF-1 que interactua amb la regió promotora MRE augmentant els nivells de transcripció de les MTs (Secció 1.41.7.2). Per altra banda *cyp1a* permet detectar compostos tipus *dioxin like*, com alguns PAHs i HAHs. Finalment *esr1* permet la monitorització de productes estrogènics (Secció 1.41.7.2.) i els gens *efl* i *ppia2* són proposats com a possibles gens de referència.

La validesa dels nostres encebadors ha estat testada mitjançant dilucions seriades obtenint-ne en tots ells eficiències properes al 100%. Dels dos gens de referència, *efl* és el que va presentar una expressió més estable per aquest estudi.

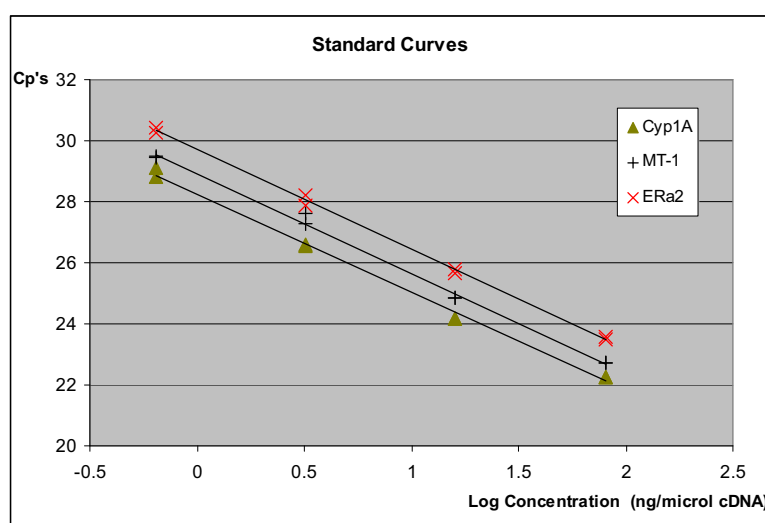


Figura 40. Rectes de regressió de *cyp1a*, *esr1* i *mt1*; cada concentració ha estat testada per duplicat

Taula:11 Rectes de regressió de cDNA (ng/microlitre DNA) Vs cp's

	R ²	Equation
<i>mt1</i>	0.9964	-3.2634x + 28.906
<i>cyp1a</i>	0.9965	-3.2634x + 28.906
<i>esr1</i>	0.9982	-3.2591x + 29.7

A la vegada, la seqüenciació de l'amplicó corresponent per a cada parell d'encebadors ens ha permès confirmar la seva especificitat per als productes gènics desitjats (Figura 41).

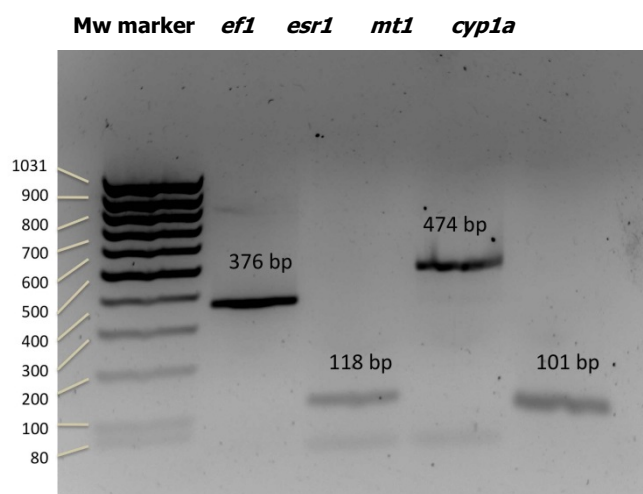
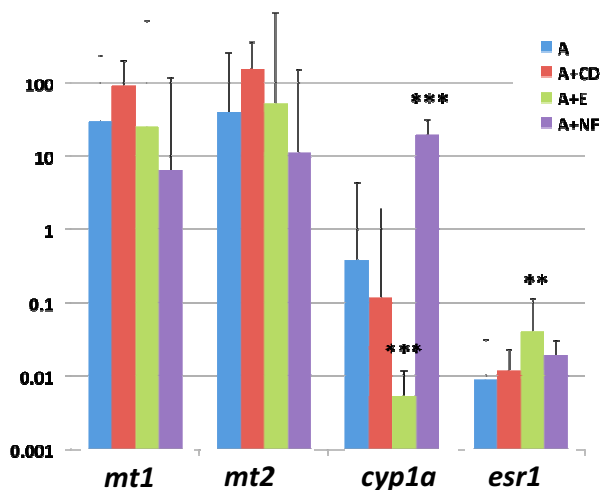


Figura 41. Productes de la amplificació per a diferents parells de primers. La mida de MW be donat en parells de bases (bp's)

S'han realitzat diverses exposicions dels individus a aigües contaminades artificialment amb Cadmi, Estradiol i β -naftoflavona per comprovar la resposta dels gens proposats com a biomarcadors. Llevat del *mt1*, els altres tres gens proposats han variat la seva expressió davant la presència dels seus contaminants específics. De tots ells, el que ha presentat una resposta més clara ha estat el *cyp1a* que ha augmentat 50 vegades la seva expressió en les mostres tractades amb β -naftoflavona respecte els controls i amb una no esperada disminució en les mostres exposades a estradiol. (Figura 42.) Aquesta disminució és deu a què *cyp1a* té una relació directa amb tots els contaminants amb capacitat d'interactuar amb el sistema de regulació del receptor tinguin o no caràcter *dioxin like* AhR (Noguerol, Boronat et al. 2006). De fet, molts receptors nuclears comparteixen molècules reguladores (corepresors, coactivadors, etc.) i els efectes encreuats entre les rutes de determinats contaminants amb efectes estrogènics i la ruta d'activació de l'expressió de *cyp1a* ha quedat demostrada en diversos estudis en peixos, com per exemple l'efecte de la supressió de l'expressió de *cyp1a* sota

l'exposició de Nonifenol, disruptor endocrí conegut, en *Salmó Salar* (Meucci and Arukwe 2006).

Figura 42 .Expressió relativa de *mt1*, *mt2*, *cyp1a* i *Esr1* (Expressat com a ‰ respecte el gen de referència) a peixos control (A, aigua d'Abrera) i peixos tractats amb Cd (A+Cd), estradiol (A+E2) y β -naftoflavona. Els asteriscs indicant les diferències significatives en relació al control (A) *, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0001$



La baixa resposta de les MTs coincideix amb estudis previs realitzats amb *Cyprinus carpio* exposats a aigües contaminades amb mercuri (Quirós et al., 2007b, Navarro et al., 2009) on quedava de manifest que aquests biomarcadors presenten unes variacions d'expressió molt petites sempre i quan no s'utilitzi el ronyó com a teixit diana, on les MTs pateixen una molt clara activació com a resposta a la presència d'ions divalents (Kagi and Schaffer 1988; Haq, Mahoney et al. 2003). Respecte el gen *esr1*, es sap que l'estradiol indueix la transcripció d'un gran nombre de gens en els teixits ossis com les escates, de fet, té un paper primordial en la regulació de l'alliberament de calci dels teixits ossis per mantenir la seva homeòstasi en sang (Vieira, Gregorio et al. ; Lehane, McKie et al. 1999; Rotllant J 2005). Probablement aquest paper tant important provoca que les variacions que s'ha observat en l'expressió del receptor d'estrògens hagin estat petites, tot i l'alta concentració d'estradiol a les que han estat sotmesos els peixos.

6.2.2 Validació del protocol d'Amplificació mitjançant CellAmp™ i comparació dels resultats obtinguts amb la metodologia clàssica.

Una vegada s'ha comprovat el correcte funcionament dels biomarcadors proposats per als contaminants que esperem trobar al riu Llobregat i degut a la falta d'informació sobre el procés d'amplificació del material genètic al qual s'ha sotmès les mostres, decidim testar la solidesa d'aquest sistema comparant-lo amb el sistema clàssic on no es

produeix cap amplificació. Els resultats més sòlids s'han obtingut amb el biomarcador *cyp1a*, per tant és el candidat ideal per avaluar el nou protocol.

Per aquest motiu, s'ha comparat l'expressió de *cyp1a* en la mateixa mostra d'escata sense amplificar i amplificades.

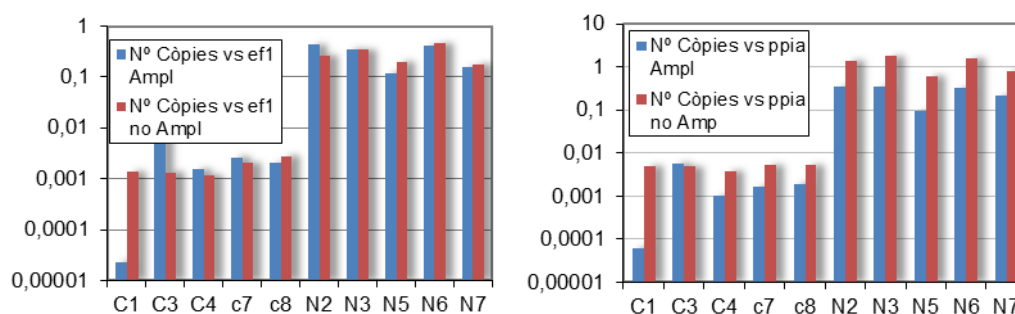


Figura 43. Valors normalitzats de la expressió de *cyp1a* (Expressat com a % respecte el gen de referència) utilitzant *efl* i *ppia2* dels individus control respecte els exposats a aigües contaminades artificialment amb β -Naftoflavona.

Aquestes dades han mostrat com l'estimació del nombre de còpies de *cyp1a* han estat molt similars a motres amplificades i sense amplificar quan s'ha utilitzat *efl* com a gen de referència, en canvi es van observar diferències significatives quan es va utilitzar *ppia2* com a gen de referència. Aquest efecte és una conseqüència directa del procés d'amplificació, ja que les mostres amplificades, sistemàticament mostraren un excés de còpies de *ppia2* relativament als altres gens analitzats. Per tant, al observar una major consistència en els resultats utilitzant *efl* decidim utilitzar-lo com a gen de referència sempre i quan treballem amb mostres amplificades. Aquestes dades han posat de manifest, que tot i la viabilitat del protocol proposat mitjançant la utilització del Kit d'amplificació, tots els biomarcadors i gens de referència han de ser testats prèviament per tal de corroborar que el protocol no interfereixi en els resultats.

Les nostres dades (tant les provinents de mostres amplificades com sense amplificar) no mostren diferències significatives d'expressió de *cyp1a* al fetge dels animals tractats amb BNF durant 24 hores, mentre que si es veu un clar efecte a les escames. La nostra conclusió és que les escames responen més ràpidament que el fetge a la presència de compostos tipus dioxin-like, i que per tanyla utilització d'escames permès reduir dràsticament el temps d'incubació dels individus a 24 hores. Aquests resultats són compatibles amb dades anteriors (Quiros, Raldua et al. 2007), que mostraren una

activació del mateix gen a *Carassius auratus* més ràpida a les escates que al fetge. De fet, els protocols d'exposició en animals indiquen que aquests tenen que estar un mínim de 10 dies sota les condicions del medi a testar si es vol valorar biomarcadors d'expressió utilitzant òrgans interns com a teixit diana (Arukwe and Roe 2008; Xuereb, Bezin et al. 2011). Aquesta reducció en el temps d'incubació permet augmentar la capacitat d'anàlisi de la metodologia i per tant monitoritzar diàriament la font de contaminació objecte de l'estudi.

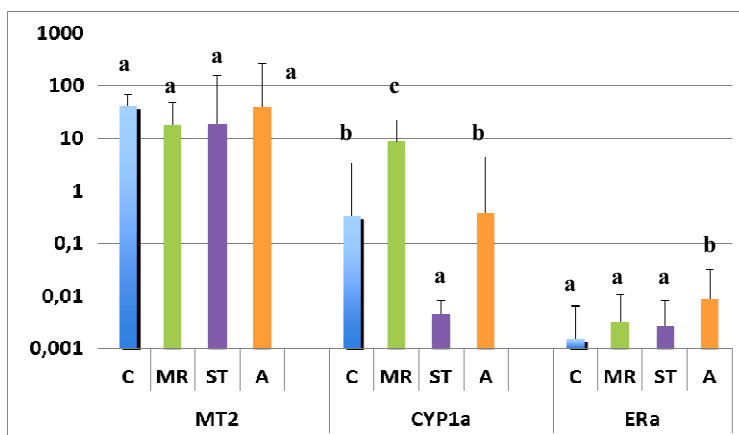
6.2.3 Monitorització ambiental del tram baix del riu Llobregat mitjançant escames de *Danio rerio*.

Després de realitzar tots els passos previs per testar la viabilitat del nou protocol, aquest es va aplicar a l'anàlisi de mostres de camp recol·lectades i comparant l'expressió dels 3 biomarcadors proposats amb els individus controls exposats a aigües contaminades artificialment al laboratori.

Els nostres punts d'estudi es situen a l'entrada d'aigua de dues potabilitzadores que distribueixen l'aigua per al consum humà a les poblacions de Terrassa i Barcelona. El primer punt, la Mina Pública, està situada al municipi d'Esparraguera i rep la contaminació procedent d'Abrera i dels polígons industrials d'Olesa de Montserrat i del Bruc entre d'altres. El segon punt a l'entrada d'aigua de la purificadora d'aigua de Sant Joan Despí, està situat aigües avall del primer punt i rep els contaminants provinents dels polígons industrials de la zona de Martorell. Finalment el tercer punt de recollida s'ha realitzat al lloc de descàrrega (Tub Governador) de l'aigua de rebuig de la potabilitzadora de Sant Joan Despí a la població de Molins de Rei.

Com es pot observar a la figura 44, la *mt2* no pateix cap variació en la seva expressió gènica a les escates dels peixos exposats a les diferents mostres d'aigua, el que suggereix una baixa o nul·la contaminació per metalls pesats en les mostres analitzades. De totes formes no podem afirmar-ho amb total seguretat, ja que els biomarcadors basats en l'expressió de les Mt's han demostrat ser poc sensibles en la nostra metodologia. En el cas dels disruptors endocrins, el gen *esr1* ha mostrat un augment en la seva expressió en les mostres de la Mina Pública, encara que la baixa activació del gen fa que aquesta dada no es pugui prendre amb total certesa (Fig.2)

Figura 44. Expressió relativa de *mt2*, *cyp1a* i *esr1* (Expressat com a %0 respecte el gen de referència) en peixos mantinguts al laboratori amb aigua reconstituïda (C), provinents del mostreig de la Mina Pública d'Abrera (A), el Tub Governador de Molins de Rei (MR) i St. Joan Despí (ST). Les lletres mostren els grups homogenis (Tukey, $p < 0.05$) per cada gen.



Finalment, els resultats han indicat un clar augment de l'expressió de *cyp1a* en els peixos exposats amb l'aigua de Molins de Rei respecte als controls, indicant la presència de compostos *dioxin like* en aquest punt, que probablement amb total certesa provenen del procés de potabilització en el qual es realitzen diversos tractaments amb productes clorats. La seva proporció augmenta considerablement en les aigües de rebuig.

Aquests resultats mostren la viabilitat del protocol proposat: és senzill, evita la mort de l'animal d'experimentació, requereix un temps d'exposició curt (24h) i ha demostrat una bona sensibilitat en la detecció de contaminants amb capacitat d'interactuar amb el receptor AhR.

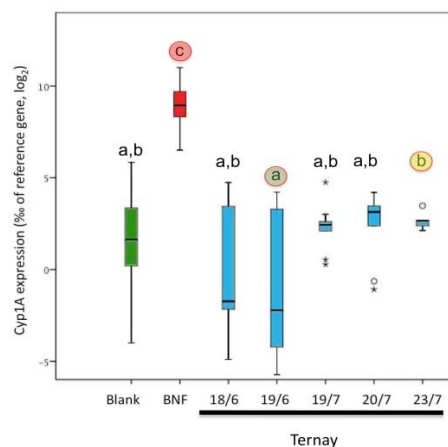
6.2.4 Validació de la Monitorització diària amb escames de *Danio rerio*.

Els sòlids resultats i l'alta sensibilitat de *cyp1a* com a biomarcador invita a testar la capacitat del nostre sistema per analitzar aigua recollida diàriament utilitzant únicament aquest biomarcador. En aquest cas, els resultats dels assaigs biològics han estat complementats amb anàlitiqes químiques. Es realitzen sis mostres repartits en dues temporades ben diferenciades (estiu i tardor) alternant els punts de mostreig mencionats anteriorment. La primera temporada es recullen mostres a les entrades de les dues potabilitzadores i a la segona a l'entrada i la sortida de les aigües de rebuig de la potabilitzadora de St. Joan Despí. Dins del mateix projecte, s'han analitzat les mostres provinents del Riu Roine (Tarnay, França), que travessa una de les zones

industrialitzades més importants d'Europa i poblacions amb una alta concentració d'habitants. Aquest mostreig s'ha pogut realitzar gràcies a la col·laboració de R+I Alliance que ha cedit 6 mostres, 3 recol·lectades al juny i 3 més al juliol.

En les mostres provinents de França no s'ha observat cap inducció de l'expressió de *cyp1a* al comparar-les amb el grup control.

Figura 45. Expressió relativa de *cyp1a* (Expressat com el % respecte el gen de referència) en peixos mantinguts al laboratori amb aigua reconstituïda (Blank), amb aigua reconstituïda + 1 μ M β -Naphthoflavone (BNF) i aigües de Ternay (Els números indiquen la data de la recollida dia/mes). Les lletres mostren els grups homogenis (Tukey, $p < 0.05$).



Tot i que no existeix cap diferència entre les mostres recol·lectades a Ternay respecte els individus controls, les mostres recol·lectades al juliol han mostrat un augment en l'expressió respecte les mostres pertanyents al mes de juny suggerint una variació en la composició de l'aigua entre aquests dos mesos (Taula 12).

Taula 12 Expressió de CYP1a entre Juny i Juliol a les mostres del riu Roina

	N	Expressió CYP1A ^a	p^b
Juny	16	0.59 \pm 4.46	4x10 ⁻⁴
Juliol	24	9.70 \pm 2.68	

a) % respecte el gen de referència.

b) T-Student test mitjançant els valors normalitzats

Les mostres del Llobregat han presentat un patró d'activitat *dioxin like* més complex, amb variacions geogràfiques i temporals que en alguns punts han superat més d'un ordre de magnitud. A l'estiu s'ha presentat una pauta repetida en els dos punts de mostreig, amb un augment en l'expressió gènica a partir del dia 7 amb el màxim situat el dia 11 juny, dia a partir del qual ha disminuït de forma constant el número de còpies del mRNA de *cyp1a*. Aquesta variació temporal sembla estar relacionada amb un augment significatiu del cabdal del riu degut a les fortes pluges dels dies anteriors. De fet, el riu Llobregat sol presentar un cabdal menor d'uns 25 m³/s, acompanyat d'uns valors elevats de salinitat i terbolesa, i durant la temporada d'estiu el flux s'ha

incrementat entre 2 i 4 vegades acompanyat d'un augment en la terbolesa i una disminució de la conductivitat (Figura 46). Aquestes dades indiquen que la contribució de contaminants al riu durant el període de temps analitzat ha estat constant. La disminució en l'expressió de *cyp1a* ha estat deguda a l'augment del cabdal de riu que ha provocat una disminució en la concentració dels contaminants amb activitat *dioxin like*, tot i que amb segurament el seu contingut total s'ha mantingut constant.

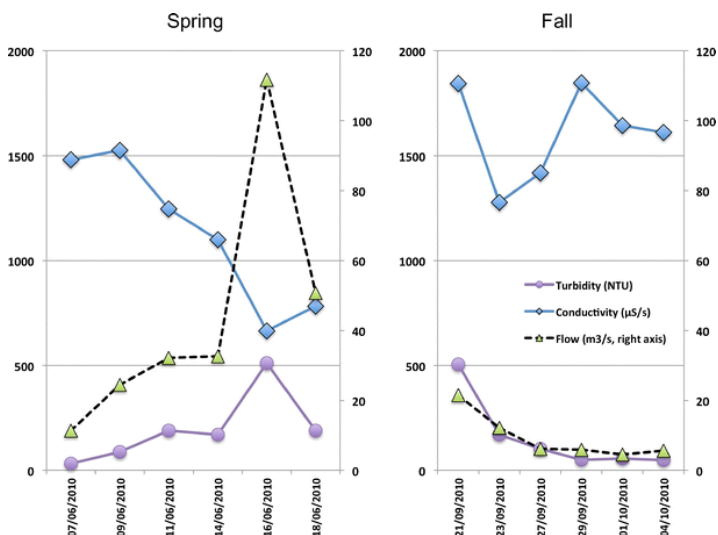


Figura 46. 3 Expressió temporal de la terbolesa (en NTU), conductivitat (en µS/cm) i cabdal del riu (en m³/s). Els valors corresponen al punt de mostreig de Sant Joan D'Espí les temporades d'estiu i tardor.

A la tardor el patró d'expressió ha presentat una activitat dioxina uniforme amb un petit augment el dia 21 de setembre. Coincidint amb les dades anteriors (Secció 6.2.3), les mostres corresponents a les aigües de rebuig del procés de potabilització han mostrat una activitat entre dos i quatre vegades superior a l'aigua recol·lectada abans d'entrar a la potabilitzadora.

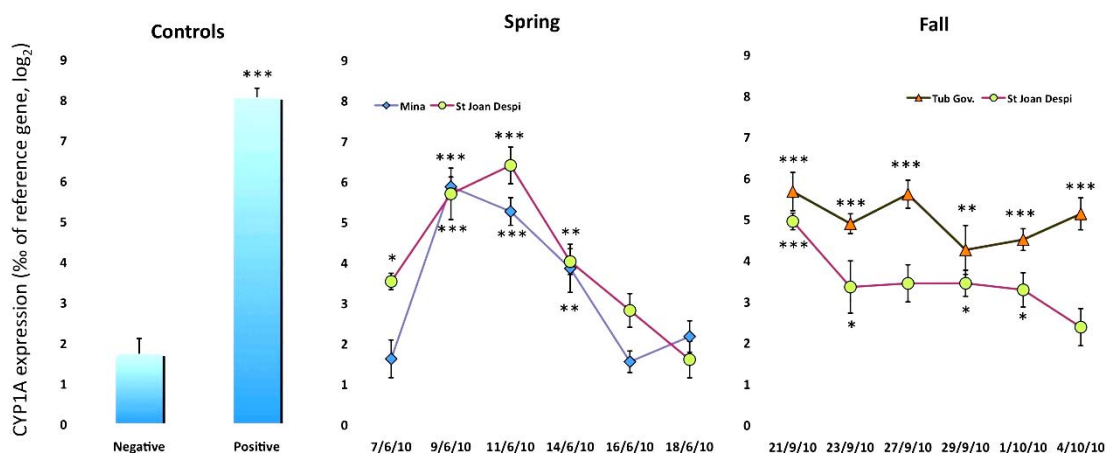


Figura 47 Expressió relativa de *cyp1a* (Expressat com a % respecte el gen de referència) a peixos control (Negative), peixos amb aigua reconstituïda + 1 µM β-Naphthoflavone (positive control) i peixos exposats a aigua de La Mina de Terrassa (Mina), St. Joan Despí o Tub del Governador (Tub Gov), de les temporades d'estiu i tardor. Els asteriscs indicant les diferències significatives en relació al control negatiu (T-Student, *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001)

Els estudis analítics en consonància amb altres estudis previs al riu Llobregat (Brix, Postigo et al. ; Cespedes, Lacorte et al. 2005), han demostrat la presència de microcontaminants, la majoria de caràcter estrogènic, en 18 de les 24 mostres processades. De tots ells el Nonifenol i el Bisfenol A són els que s'han trobat en major freqüència (58% i 42% respectivament), tot i que també s'han pogut detectar Octinofenol i Estriol en una menor proporció. No s'han detectat ni PCBs ni PAHs. La màxima concentració de contaminants es presenta en les mostres de rebuig de la purificadora de St. Joan Despí seguides de les mostres recol·lectades a la seva entrada. Les diferències observades entre l'entrada de la Mina Pública i St. Joan Despí reflecteixen l'acumulació de contaminants a mida que el riu avança cap a la seva desembocadura i amb tota seguretat té una relació directa amb els abocaments realitzats en el polígon industrial de Martorell, situat entre els dos punts.

L'absència de PCB's (Nusse, Beisker et al. 1994) i PAH's en les mostres recol·lectades invita a concloure que l'alteració de la regulació de *cyp1a* ha estat provocada per un element a priori no sospitós d'interactuar amb el receptor AhR. De tots els paràmetres químics analitzats, només el nitrit i un cert nombre de microcontaminants, tots ells amb activitat estrogènica, han presentat una correlació amb el patró d'expressió de *cyp1a* (Figura 48). A priori, aquests contaminants són sospitosos únicament de provocar variacions en la ruta regulada pel receptor d'estrògens, però com s'ha mencionat anteriorment (Secció 6.2.1), s'ha comprovat al llarg de diversos estudis que les dues rutes presenten punts de connexió entre elles. A més, tot i que existeixen grans diferències estructurals entre els compostos amb activitat estrogènica i els que tenen la capacitat per activar l'AhR, s'ha comprovat que alguns compostos estrogènics tenen la capacitat per activar aquest receptor. Per tant, podem concloure que el patró d'expressió de *cyp1a* ha respòs a la presència de microcontaminants d'origen antropogènic, així com de ramaderies i conreus situats al llarg de riu. Aquestes dades coincideixen amb la variació del patró d'expressió de *cyp1a* lligat a l'augment del cabdal de riu. Això indica una contribució constant de contaminants al riu, ja que aquest tipus de tòxics, a diferència dels provinents dels abocaments industrials, se solen difondre al riu de forma constant, com per exemple mitjançant la filtració dels purins a través del sòl cap al riu.

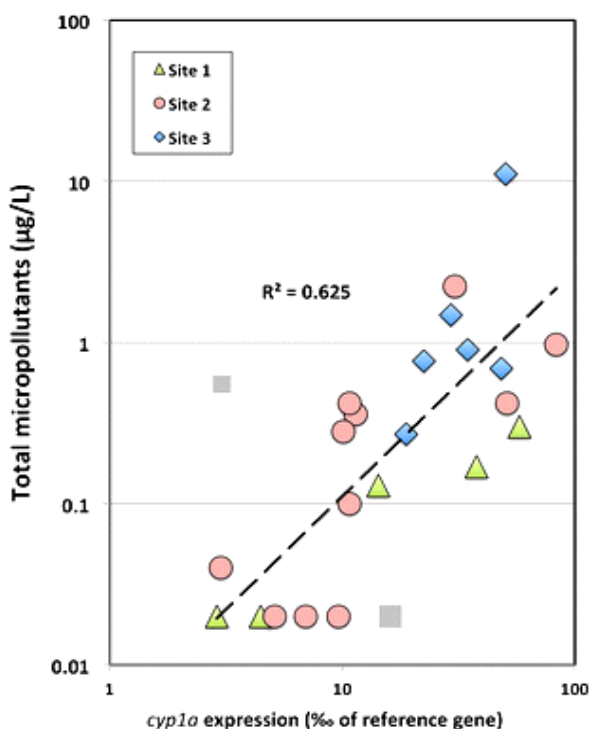


Figura 48. Correlació entre els nivells del mRNA de *Cyp1a* i la quantitat total de microcontaminants a les mostres d'aigua on s'han exposat els peixos. Els llocs de mostreig estan indicats amb diferents símbols (Verd – Abrera, Vermell – St Joan d'Espí, Blau – Tub Governador). La corba de regressió està indicada amb el corresponent valor R^2 . Els dos outlayers (Quadrat Gris) no han estat inclosos en la regressió.

6.2.5 Correlació de resultats amb la valoració de la toxicitat de les mostres mitjançant la normativa ISO 15088.

Molts xenobiòtics, entre ells els disruptors endocrins, presenten un augment o variació en els seus efectes si l'organisme exposat a ells es troba en els primers estadis de desenvolupament. Per això, s'ha relacionat la metodologia proposada a les campanyes anteriors amb una valoració de la toxicitat de les mostres analitzades mitjançant la normativa ISO 15088 (*Secció 3.4.3*), fet que ens permet relacionar els possibles efectes tòxics aguts en la fauna aquàtica en els seus primers estadis de desenvolupament. Degut a l'interès que presenten les mostres provinents de les aigües de rebuig de la potabilitzadora, en aquest cas s'han analitzat únicament mostres a l'entrada i a la sortida de la planta de Sant Joan Despí al llarg de 5 dies.

Els assaigs toxicològics han mostrat una viabilitat del 100% sense presentar cap efecte letal, excepte a les mostres recollides el dia 10 de maig a St. Joan Despí i el 9 de maig al Tub Governador.

Taula. 13 Mortalitat i supervivència de *Danio rerio* exposats 48h segons el protocol ISO 15088 a les mostres d'aigua recol·lectades a la campanya 2011

Data	Lloc	Morts	Vius	Mortalitat	Supervivència
4-maig-2011	St. J. Despí	0	10	0,00%	100,00%
9-maig-2011	St. J. Despí	0	10	0,00%	100,00%
10-maig-2011	St. J. Despí	3	7	30,00%	70,00%
11-maig-2011	St. J. Despí	0	10	0,00%	100,00%
12-maig-2011	St. J. Despí	0	10	0,00%	100,00%
9-maig-2011	Tub Governador	3	7	30,00%	70,00%

A la vegada, els resultats obtinguts amb *cyp1a* han assenyalat un major augment en l'expressió si la comparem amb les altres campanyes, evidenciant un increment temporal de la presència de microcontaminants d'origen orgànic.

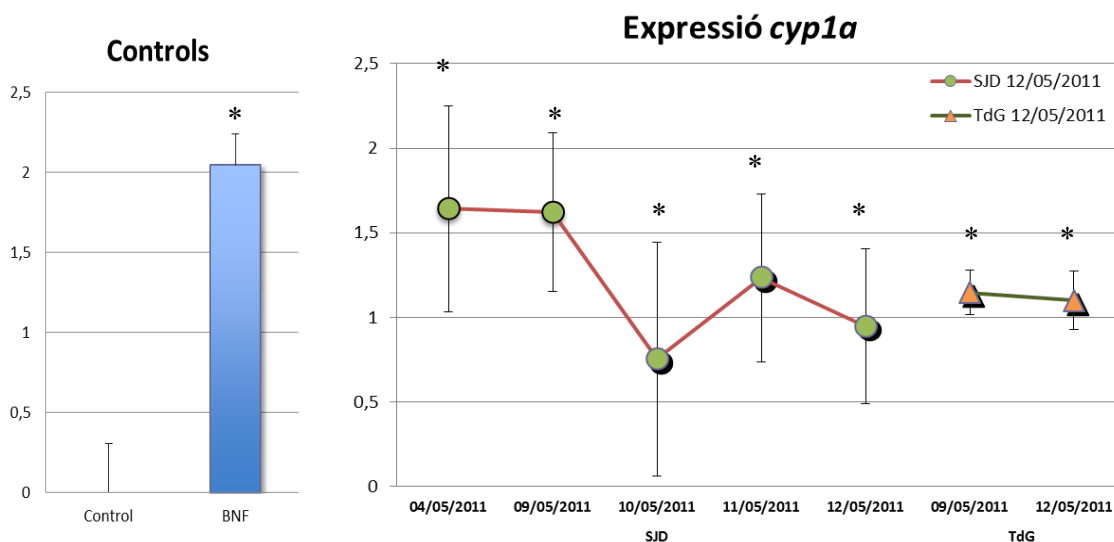


Figura Expressió relativa de *cyp1a* (Expressat com a %0 respecte el gen de referència a peixos control (C), peixos amb aigua reconstituïda + 1 μ M β -Naphthoflavone (BNF) i peixos exposats a aigua de St. Joan Despí (SJD) i Tub del Governador (TdG). Els asteriscs indicant les diferències significatives en relació al control negatiu (T-Student, *, $p < 0.05$;))

No ha estat possible relacionar la presència de contaminants tòxics per als eleuteroembrions amb un augment de l'expressió de *cyp1a*, el que suggereix la presència de xenobiòtics amb la capacitat d'unir-se al AhR però sense efectes tòxics aguts i incapaços d'afectar el desenvolupament embrionari del peix zebra.

Com a conclusió, les campanyes de 2009 i 2010 han permès validar l'eficàcia del sistema de detecció i relacionar-lo amb la composició i presència de contaminants al riu. A la vegada, la campanya de 2011 ha permès comparar els efectes que provoquen els compostos detectables mitjançant l'expressió del gen *cyp1a* sobre el desenvolupament normal dels embrions de *Danio rerio*.

Capítol 2. Estudi dels efectes subletals dels disruptors tiroïdals en els primers estadis del desenvolupament a *Danio rerio*

6.3. Canvis induïts per la Triiodotironina en el transcriptoma de Zebrafish durant la fase embrionària. Efectes sobre el metabolisme lipídic i implicacions del Bisfenol A en la toxicitat durant el desenvolupament.

6.3.1 La Disrupció tiroïdal i els seus efectes sobre el metabolisme lipídic en eleuteroembrions de *Danio rerio*. Efectes del fàrmac Amiodarona sobre el correcte desenvolupament del sistema tiroïdal.

El nostre estudi es centra en l'anàlisi dels efectes subletals dels disruptors tiroïdals en els primers estadis del desenvolupament, profunditzant en els seus mecanismes toxicològics i aportant una metodologia per a la seva detecció mitjançant la utilització de biomarcadors d'expressió gènica. A diferència d'altres disruptors endocrins, i degut a la complexitat del seu estudi, la informació disponible sobre els possibles compostos ambientals que poden alterar el correcte funcionament del metabolisme tiroïdal és relativament escassa. A més, les possibles perturbacions produïdes pels xenobiòtics tenen una especial importància si els organismes exposats es troben en els primers estadis del desenvolupament, ja que en aquest punt els organismes presenten un augment en la sensibilitat pel desencadenament d'alteracions, malalties o perturbacions del correcte funcionament endocrí. Aquests efectes prenen gran importància en els compostos amb la capacitat d'alterar el sistema tiroïdal, ja que gran part d'ells tenen caràcter lipofílic, el que possibilita que travessin la barrera placentària o que es transmetin al nadó durant la lactància per mitjà de la llet materna.

En el nostre cas concret, el peix zebra es presenta com un model apropiat en el disseny de nous biomarcadors gènics. La utilització dels seus eleuteroembrions permet l'estudi dels efectes dels disruptors tiroïdals en els primers estadis del desenvolupament. En estat adult presenta una mida petita (3cm) que permet estabular i manipular un gran nombre d'individus per tal d'obtenir postes tot l'any amb una alta fertilitat (200-300 embrions per posta). Els eleuteroembrions són transparents, fet que facilita la seva observació sota la lupa, l'organogènesi és molt ràpida i com s'alimenten endògenament fins al cinquè dia permet treballar amb ells com a metodologia alternativa no subjecta a les normatives de la legislació en matèria d'experimentació animal. Respecte altres tècniques, presenta un gran nombre d'avantatges sobre altres mètodes alternatius com

els cultius cel·lulars, ja que al cinquè dia els eleuteroembrions de *Danio rerio* ja tenen la major part dels òrgans desenvolupats i operatius. D'aquesta forma, amb un únic assaig es pot avaluar la toxicitat a nivell cel·lular, d'òrgan o d'un individu complet. La utilització de metodologies genòmiques està plenament justificada, el coneixement actual sobre els gens de resposta a la disrupció tiroïdal és escàs i la gran versatilitat que ofereixen aquestes tècniques vers les bioquímiques permet considerar un ampli número de respostes i vies metabòliques implicades en el sistema tiroïdal. En el cas de *Danio rerio*, la utilització d'aquests procediments és molt favorable, ja que existeix abundant informació sobre el seu genoma, que es troba totalment seqüenciat, així com diverses plataformes comercials que faciliten molt els primers estadis de la investigació.

La metodologia de detecció per mitjà de biomarcadors d'expressió està dissenyada per estudiar efectes subletals, és a dir, les concentracions dels compostos utilitzades no han de comportar un augment de la mortalitat ni efectes fenotípics greus. Per això s'han realitzat proves de toxicitat segons la normativa ISO 15088 (Secció 3.4.3) en eleuteroembrions exposats a 50nM d'hormona T3, concentració saturant i màxima a la qual han estat exposats els eleuteroembrions de *Danio rerio*. La mortalitat ha estat inferior al 10%, pel que considerem que el tractament a aquestes concentracions no ha tingut cap efecte sobre la viabilitat i el correcte desenvolupament dels eleuteroembrions.

Per tal d'estudiar els possibles efectes sobre el sistema tiroïdal a *Danio rerio* es van incubar grups de 30 individus amb concentracions saturants d'hormona T3 (50nM) i concentracions estàndards d'Amiodarona, un agent antiarítmic de classe III. El caràcter lipofílic d'aquest fàrmac provoca la seva acumulació en els teixits grassos, múscle, fetge, pulmons i pell. Els seus efectes secundaris són nombrosos, però en el nostre cas ens interessa la seva capacitat d'unir-se al receptor de l'hormona tiroïdal (Brunton 2010). De fet, un 14-18% dels pacients tractats amb Amiodarona pateixen alteracions en el sistema tiroïdal, la majoria d'ells desenvolupant un hipotiroïdisme, tot i que en alguns casos es pot provocar també un hipertiroïdisme derivat de la seva capacitat per inhibir la conversió perifèrica de T3 a T4 i el seu elevat grau de contingut en iode proper al 40% en pes sec (Martino, Bartalena et al. 2001). Es van dissenyar encebadors per als productes gènics de *tha*, *thb*, *doi1* i *doi2* (Secció 1.3.4.2 i 1.3.4.3). A més, per tal de relacionar-los amb l'alteració del sistema lipídic es van dissenyar encebadors per *fabp2* i *mtp* (Secció 1.4.8). S'han realitzat tots els passos previs per tal de testar la validesa dels

encebadors específics per *mtp* i *fabp2*. La presència d'una única corba de dissociació per a cada gen ha confirmat l'especificitat de l'amplificació. Els productes de la PCR (amplicons) han estat seqüenciats i comparats amb les seqüències descrites en les bases de dades (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) per confirmar una homologia entre el 95% i el 100% de cada gen analitzat.

Els individus han estat exposats a 50nM d'hormona T3 i d'Amiodarona. Les transformacions logarítmiques de les còpies de mRNA s'han ajustat a la distribució normal (Kolmogorov-Smirnov, $p < 0,05$) i s'han realitzat proves paramètriques per comparar els resultats obtinguts en relació al tractament realitzat. Com es pot observar en la figura 50 els individus exposats a l'hormona T3 i a l'Amiodarona han presentat una disminució en l'expressió de *mtp*. El tractament amb Amiodarona no ha tingut cap efecte sobre la síntesis de *fabp2*, però sí es va poder observar una disminució en la seva expressió en aquells individus tractats amb T3 (Figura 50)

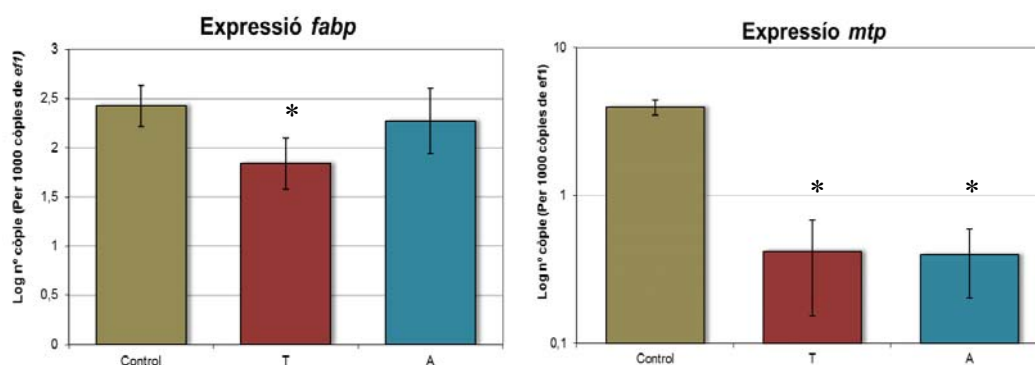


Figura 50. Quantitat de mRNA en els gens *fabp2* i *mtp* (Expressat com a %₀ respecte el gen de referència) en *Danio rerio* de 5dpf's després de ser exposats a hormona T3 (T) i Amiodarona (A). Els asteriscs indiquen diferències significatives respecte els individus control. (ANOVA, * $p > 0,05$).

Aquests resultats han posat de manifest la relació existent entre el sistema tiroïdal, les seves alteracions i el correcte funcionament del metabolisme lipídic. En l'actualitat existeixen multitud de publicacions que demostren aquesta relació en humans: alteracions en la concentració de triglicèrids en el plasma d'individus amb disfuncions tiroïdals, disminució en els nivells de lipoproteïnes en pacients amb hipertiroïdisme, augment del colesterol circulant en pacients amb alts nivells de TSH; fins i tot hi ha evidències que un percentatge elevat d'atacs de miocardi són provocats per les alteracions del colesterol circulant provocat per un hipertiroïdisme (Mazzeffi, Lin et al. ;

Heller, Miller et al. 1981; Hoppichler, Sandholzer et al. 1995; Prieur, Huby et al. 2005; Mugii, Hanada et al. 2009).

D'altra banda, els resultats obtinguts amb els gens directament relacionats amb el metabolisme tiroïdal (*tha*, *thb*, *dio1* i *dio2*) no han estat concloents, ja que el nombre final de còpies de cDNA obtingudes no ha superat el llindar del soroll de fons de la nostra metodologia. Per aquesta raó s'ha repetit l'extracció de material gènic variant el protocol establert fins al moment.

S'ha realitzat una retrotranscripció amb el kit Transcriptor de Roche substituint el Kit Omniscript de Applied. Aquests kits es diferencien en les temperatures òptimes de treball de les seves respectives retrotranscriptases. Omniscript té una temperatura òptima de treball a 37°C i el Kit de Roche de 55°C. Elevar la temperatura fins a 55°C permet eliminar determinades estructures secundàries formades per complementaritat de bases del mRNA lineal, fet que facilita l'acció de la retrotranscriptassa i augmenta la seva eficiència. Mitjançant aquest canvi, l'efectivitat del nostre protocol ha augmentat avançant 6 cicles les lectures dels valors Ct de la qRT-PCR, el que representa una quantitat de cDNA al final de la retrotranscripció 100 vegades superior (Figura 51).

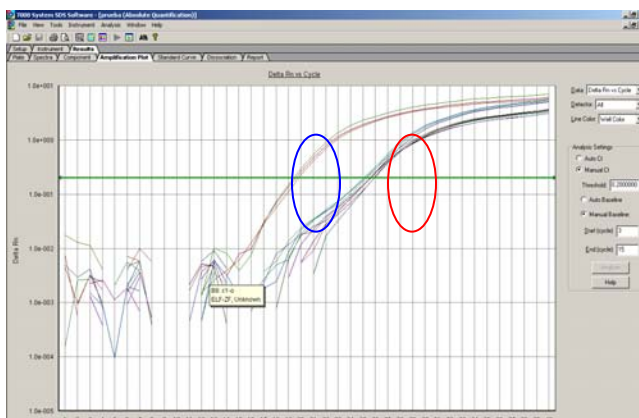


Figura 51. Captura de pantalla dels resultats obtinguts per mitjà de la qRT-PCR obtinguts del mateix individu mitjançant la retrotranscripció amb el kit Transcriptor de Roche (Blau) substituint el Kit Omniscript de Applied (Vermell) utilitzant els encebadors de *tha*.

Els resultats obtinguts han estat sotmesos als mateixos càlculs estadístics que les anàlisis de *fabp* i *mtp*. L'expressió de *tha*, *thb* i *dio2* ha presentat un mateix patró en tots els casos. Tots els individus tractats amb hormona T3 han mostrat un augment en la seva expressió, però no ho han fet en els individus que van ser tractats amb Amiodarona (Figura 52).

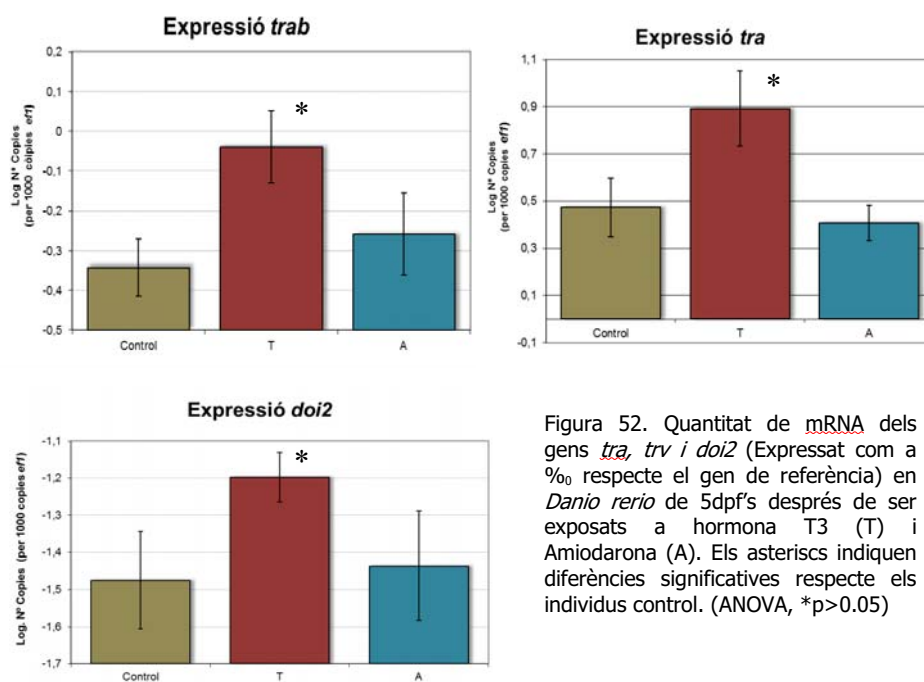


Figura 52. Quantitat de mRNA dels gens *tra*, *trv* i *doi2* (Expressat com a %₀ respecte el gen de referència) en *Danio rerio* de 5dpf's després de ser exposats a hormona T3 (T) i Amiodarona (A). Els asteriscs indiquen diferències significatives respecte els individus control. (ANOVA, *p>0.05)

Aquests resultats mostren com l'Amiodarona no ha causat cap efecte en l'expressió de determinats gens clau del sistema tiroïdal. Això reforça la hipòtesis que els seus efectes desencadenants de l'hipertiroïdisme poden ser relacionats únicament amb la inhibició del sistema de la transformació ORD (Martino, Bartalena et al. 2001). Tots tres gens han mostrat una sobreexpressió en els individus tractats a concentracions saturants de T3, fet que ha evidenciat que el sistema tiroïdal presenta un sistema de retroalimentació que provoca un augment en els mecanismes de control al augmentar la concentració d'hormona T3 per tal de regular la seva acció i degradació. Les concentracions a les que s'ha exposat els individus són considerables i difícilment reproduïbles en un entorn natural. Tenint en compte que cap dels gens ha presentat unes variacions elevades en la seva expressió, concloem que cap d'ells pot ser considerat candidat a biomarcador ideal per a la detecció de la disrupció tiroïdal. De totes maneres, considerem que aquests marcadors sí que poden ser útils en estudis farmacològics i d'exposició humana en general.

6.3.2 Transcriptoma i efectes fenotípics durant el desenvolupament embrionari de *Danio rerio* (Article 3).

Mitjançant l'exposició a l'hormona T3 (50nM) i la seva posterior anàlisi amb la plataforma G2519F (Agilent Tech, USA) específica per *Danio rerio* s'ha obtingut el perfil del transcriptoma dels individus exposats a un possible agent agonista del sistema tiroïdal. Aquest estudi ens ha permès observar la totalitat del transcriptoma dels eleuteroembrions de *Danio rerio* i obtenir una visió global dels canvis que s'hi han produït i quins són els gens que han mostrat una alteració més aguda.

De les més de 37.000 sondes analitzats, 538 han augmentat la seva expressió i 114 l'han disminuït significativament ($p < 0,005$), suggerint canvis en només una petita part dels transcriptoma (Figura 53).

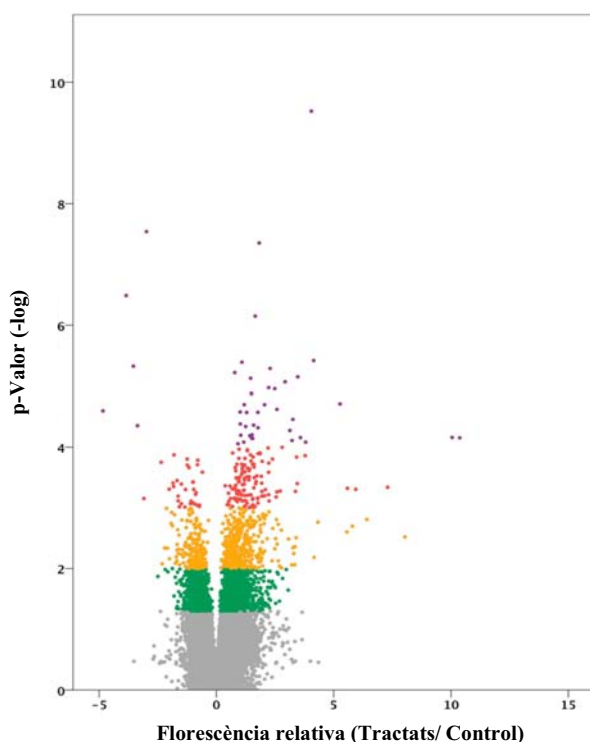


Figura 53. Volcano plot. Connexió dels p valors (eix Y) i el log2 del "fold change" de l'expressió dels eleuteroembrions exposats a T3 50nM respecte els individus control. Els colors indiquen el grau de significança: Gris (No Dif. Sign.), Verd ($p < 0,05$), Groc ($p < 0,01$), Vermell ($p < 0,001$) i Lila ($p < 0,0001$)

L'estudi bioinformàtic de les dades obtingudes mitjançant Gene Ontology (Secció 1.5.3.2) ha permès analitzar els gens que han variat la seva expressió sota l'acció de l'hormona T3 exògena per agrupar-los en diferents grups funcionals. S'ha observat que tots ells estan relacionats amb tres sistemes lligats al desenvolupament: el sistema ossi (Formació de l'esquelet, metabolisme del Ca), el sistema visual (Opsines i diversos

enzims presents a la retina), conjuntament amb elements estretament relacionats a aquest com els gens relacionats amb cicle circadià i el metabolisme retinòic, i un últim grup de gens relacionats amb el sistema hematopoètic (Hemoglobines adultes i embrionàries) (Taula 14).

Taula 14. Anàlisi funcional dels canvis d'expressió sota el tractament d'hormona T3

Functional analysis of expression changes upon T3 treatment				
Function	Go terms	Up	Down	Changed ^b
Ossification, Skeleton, Ca ion binding	GO:0001503, GO:0001501, GO:0005509	alox12, anxa1b, anxa3, asph, calua, cbs, dlx3b, edem1, egr17, ehd2, epd, fklp10, frzb, icn, lect1, lox, mgp, mmp14a, mmp14b, mmp2, myf5, myl2, rcn3, tgfb1, thbs3a, thra, tp63, zgc:110283, zgc:162651, zgc:162879	guca1a, guca1b, tfa, zgc:114180, zgc:85932	36
Visual function, light stimulation, circadian cycle, retinoid metabolism	GO:0007601, GO:0009416, GO:0042752, GO:0006776, GO:0005501	opn1lw1, pitpna, tyr, cyp26a1, ptgds, retsat	rs1, pde6c, opn1sw2, grk7b, arnt12, opn1mw1, grk7a, exorh, per2, atoh7, pde6a	14
Oxygen transport	GO:0015671	ba2, hbbe2, si:ch211-5k11.6	hbae1, hbae3, hbbe3	6
a)Over or under represented in T3-treated samples				
b)Hypergeometric distribution. Calculated over 752 significantly changed (p<0.01) genes out of 28,115 annotated zebrafish genes				

Per tant, aquests canvis en el transcriptoma de *Danio rerio* en els primers estadis del desenvolupament, tot i afectar a un petit nombre de gens i no tenir efectes letals sobre els embrions, suggereixen l'important paper que juga el sistema tiroïdal en la regulació fina del desenvolupament embrionari.

S'ha seleccionat un gen representatiu de cada grup funcional per tal d'avaluar, ampliar i afinar mitjançant qRT-PCR els resultats obtinguts amb la plataforma d'hibridació. Els gens seleccionats han estat: *opn1/w1* codificant per l'opsina LWS-1 sensible a l'espectre lumínic vermell, *hbae3* que codifica per la cadena α de la globina embrionària tipus 3, el transcrit *si:ch211-5k11.6* (*hba2*) que ho fa per la cadena α de globina adulta tipus 2 i *thra* que ho fa per al receptor de l'hormona tiroïdal α . S'han seguit tots els procediments de control que inclouen: l'anàlisi de la corba de dissociació, la confirmació de la mida de l'amplicó, la determinació de l'eficiència i la seqüenciació de l'amplicó per cada gen estudiat. L'expressió d'mRNA es va calcular segons la quantificació relativa a dos gens de referència (*efl* i *ppia2*).

Coincidint amb els resultats obtinguts prèviament amb la plataforma d'Agilent, el nombre de còpies de mRNA de LWS-1, TR α i la Globina Adulta augmenten de forma

significativa respecte els individus control, a la vegada que la Globina embrionària disminueix la seva expressió (Figura 54).

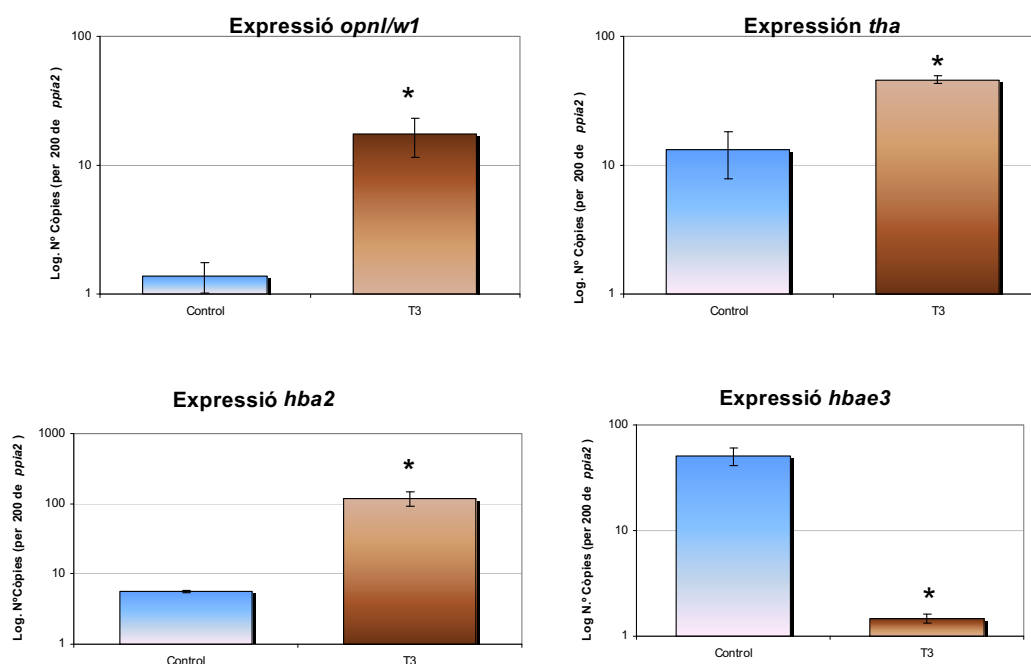


Figura 54. Quantitat de mRNA dels gens *hbae3*, *hba2* i *opnl/w1* (Expressat com a % respecte el gen de referència) en *Danio rerio* de 5dpf's després de ser exposats a l'hormona T3 (T3). Els asteriscs indiquen diferències significatives respecte els individus control. (REST *p>0.05).

Posteriorment, s'ha realitzat un experiment dosi/resposta amb concentracions creixents de T3. Com es pot observar a la figura 55 aquest ha demostrat que l'expressió / repressió dels gens relacionats amb els tres sistemes estudiats (visual, ossi i sanguini) presenten una relació directa amb la quantitat de T3 exògena administrada, ja que l'augment en la progressió de l'expressió de *hbae3*, *opnl/w1* i *thra* i la disminució en el nombre de còpies de mRNA de *hba2* s'ha produït de forma dosi dependent a T3.

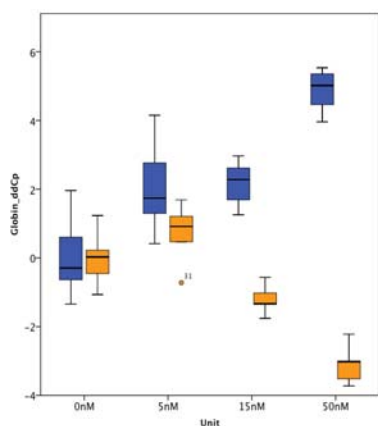


Figura 55. Box-plots dels valors $\Delta\Delta C_p$ (Tractats vs No Tractats) de l'hemoglobina adulta (blau) i l'embrionària (taronja). El Asteriscs indiquen els nivells de significança: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001

Aquestes dades han posat de manifest que, com succeeix en els amfibis, el sistema tiroïdal té un paper fonamental en el desenvolupament dels eleuteroembrions i que la regulació existent sobre determinats gens és essencial en les fases de transició a adult o metamorfosi, controlant la degradació de teixit larval i l'organogènesi cap a la fase adulta (Shi, Wong et al. 1996). En el desenvolupament normal del peix zebra, la majoria de canvis produïts que podem classificar com a “metamorfosi” es produeixen entre la tercera i la quarta setmana del desenvolupament mitjançant l'expressió/repressió de determinats gens clau. Més concretament, el sistema circulatori pateix durant el desenvolupament una migració de la localització de l'hematopoesi i la progressiva substitució de globines embrionàries per adultes (fig). A dia d'avui es coneixen 6 gens que codifiquen per les hemoglobines embrionàries (*hae1*, *hae2*, *hae3*, *hbe1*, *hbe2* i *hbe3*) i 5 per les adultes (*haa1*, *haa2*, *haa3*, *hba1* i *hba2*). La principal diferència entre els dos grups radica en la major afinitat a l'O₂ i un menor efecte Bhor de les hemoglobines embrionàries. L'efecte Bhor es refereix a la capacitat de l'hemoglobina de disminuir la seva afinitat per l'oxigen a baix pH, pel que els embrions tenen la capacitat de mantenir el transport d'oxigen tot i les possibles variacions de pH internes, molt més comunes en els primers estadis del desenvolupament que en organismes adults (Figura 56).

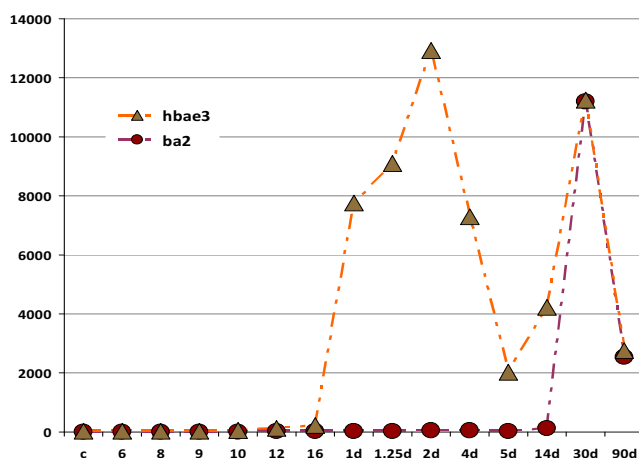


Figura 56. Expressió de *hbae3* i *hba2* durant els primers 90 dpf's (Eix X Axis) en unitats arbitràries (Eix Y). *Konantz, Saric. Array Express, E TABM 33*

Com succeeix amb el patró d'expressió de les hemoglobines, l'expressió dels gens de les diferents opsines (sistema visual) està estretament lligada al desenvolupament. A diferència dels individus adults, en els eleuteroembrions l'opsina majoritària és la LWS-2, mentre que la LWS-1, que mai apareix abans del 3dpf, s'expressa en menor quantitat i d'una manera més localitzada a la retina. Tots aquests canvis són generats, en gran

part, per les hormones tiroïdals mitjançant l'acció dels TRs. Tot i que en aquests estadis els fol·licles tiroïdals encara no s'han desenvolupat totalment, el receptor nuclear TR α es sintetitza durant els primers estadis de desenvolupament i es manté en totes les etapes del desenvolupament de *Danio rerio* amb pics màxims d'expressió durant les fases de gàstrula i blàstula.

Els resultats que s'han obtingut i que es poden observar en la figura 57 han mostrat que Lws-1, la globina adulta i la globina embrionària objecte de l'estudi presenten un patró d'expressió pròpia d'un embrió de, com a mínim, 14dpf's i no de 5dpf's. (Figura 57).

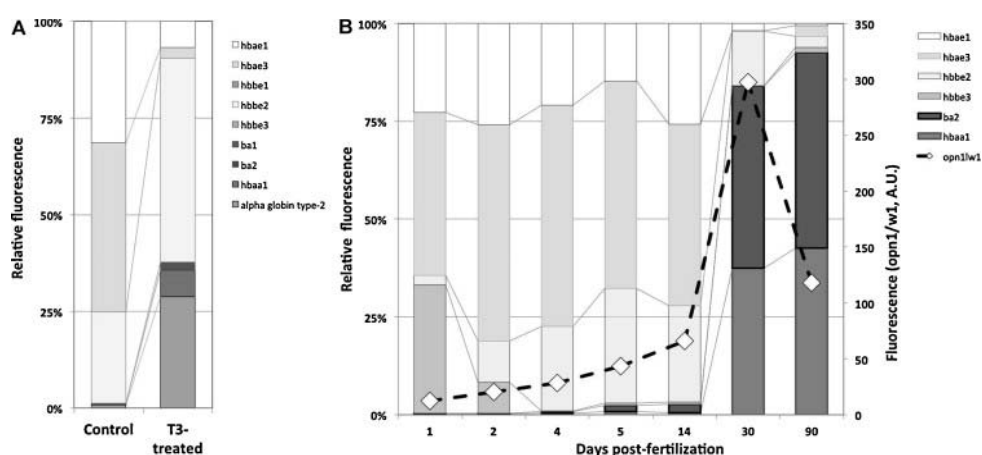


Figura 57. A- Expressió relativa de *hbae3* i *hba2* en *Danio rerio* de 5dpf's després de ser exposats a 50nM d'hormona T3. Les barres corresponen a la desviació estàndard. B- Expressió relativa dels transcrits de diverses hemoglobines durant el desenvolupament embrionari, larval i juvenil de *Danio rerio*.

El tractament amb hormona T3 exògena i, per tant, tots aquells xenobiòtics amb la capacitat agonista a l'acció de T3, ha provocat un canvi en l'expressió temporal de determinats gens claus per al correcte desenvolupament embrionari. Això desencadena un avanç temporal o un canvi en el patró de transcripció d'aquest tres sistemes estudiats, estretament relacionats amb els processos de transició larvària o "metamorfosi", tot i que el sistema tiroïdal en aquests estadis del desenvolupament no sigui totalment funcional. Paral·lelament als estudis dels efectes dels disruptors tiroïdals en eleuteroembrions de *Danio rerio*, s'ha aportat un recull de tècniques per a la seva detecció. Aquesta metodologia, basada en la utilització de biomarcadors d'expressió gènica, presenta un protocol senzill, ràpid i fàcilment reproduïble amb unes quantitats mínimes de mostra (10ml d'aigua per replicat), el que facilitaria un possible mostreig destinat a analitzar mostres de camp. La supervivència dels individus analitzats obre la

porta a una possible monitorització diària amb els seus conseqüents beneficis: Estudi de la resposta al llarg del temps, capacitat per discernir entre abocaments esporàdics i continuats, disminució del cost de l'establiment i manteniment dels organismes per al control ambiental, etc.

6.3.3 Efectes dels fàrmacs disruptors tiroïdals Amiodarona i Metimazol sobre el sistema visual i hematopoètic de *Danio rerio*.

El fàrmac Metimazol va sintetitzar-se per primera vegada l'any 1920 per l'empresa farmacèutica Hoechs Ag. La seva venda i distribució va ser lliure fins a principis dels anys 70, quan va ser relacionat amb la malaltia agrunilítica, que pot arribar a ser mortal. S'utilitza com a analgèsic, antipirètic, espasmolític i en el tractament de l'Hipertiroïdisme. La seva acció analgèsica es deu a la capacitat d'inhibició de la Ciclooxygenasa (COX, que disminueix la síntesis de prostaglandines i tromboxans. Pot establir els nivells adequats d'hormona tiroïdal en sang gràcies a la seva capacitat d'inhibició de l'enzim TPO (Thyroid peroxidase). El seu caràcter lipofílic li permet travessar la barrera hematoencefàlica i hematoplacentaria, convertint-lo en un fàrmac ideal en el tractament de l'hipertiroïdisme durant l'embaràs, caracteritzat per un augment dels nivells de l'hormona T4 i una disminució dels nivells de TSH. La seva presència en el medi s'ha pogut contestar en diversos estudis (*Halling-Sørensen et al., 1998; Heberer, 2002; Jones et al., 2002; Bound and Voulvoulis, 2006*) pel que la seva importància ambiental és patent.

S'han exposat grups de 30 individus a aigües contaminades artificialment amb una concentració saturant de T3 i a un mix d'Amiodarona i Metimazol. Com es pot observar en les figures següents, les mostres tractades a concentracions saturants de T3 han presentat el mateix patró d'expressió que en l'anterior experiment, amb una sobreexpressió de *opnl/w1*, *tha* i *hba* i una subexpressió en *hbea3*, el que reforça la validesa dels nostres gens seleccionats com a biomarcadors. Les mostres tractades amb una mescla de Metimazol i Amiodarona han mostrat resultats diferents depenent del gen estudiat. El gen *hbea3* ha exhibit un augment en la seva expressió indistingible estadísticament de l'observada en els individus tractats únicament amb hormona T3. El gen *tha* ha mostrat una disminució en el nombre de còpies del seu mRNA respecte els individus control, i *hba2* i *opnl/w1* no semblen haver estat afectats per l'exposició de Metimazol més Amiodarona. Els resultats per l'expressió de *hba* han estat totalment

coherents amb els fàrmacs administrats, ja que per un costat l'Amiodarona ha actuat de la mateixa forma que ho fa l'hormona T3, provocant una sobreexpressió dels seus gens, mentre que el Metimazol ha bloquejat la seva acció, donant com a resultat una expressió intermèdia entre els organismes control i els exposats a l'hormona T3. En canvi, el gen *hbae2* no s'ha vist afectat pels mecanismes d'acció antagonista del Metimazol. La disminució de l'expressió de *tha* ha estat especialment crítica i ha respòs al bloqueig directe del receptor i a la inhibició quasi bé total del seu mecanisme de retroalimentació.

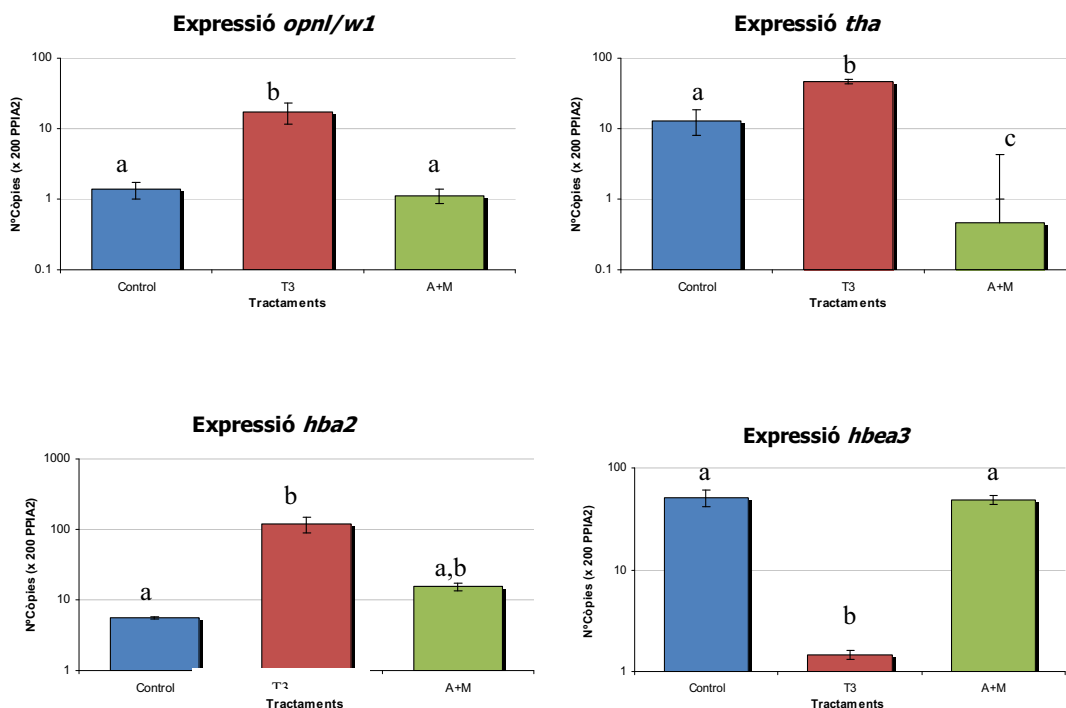


Figura 58. Quantitat de mRNA de *opnl/w1*, *tha*, *hba2* i *hbae3* (Expressat com a % respecte el gen de referència) en *Danio rerio* de 5dpf's després de ser exposats a l'hormona T3 (T3) i una mescla d'Amiodarona i Metimazol (A+M). Les lletres mostren els grups homogenis entre tractaments (Tukey, $p < 0.05$)

Si comparem aquestes dades amb les obtingudes amb la incubació d'individus únicament amb Amiodarona (Secció 4.1), es posa de manifest que l'acció conjunta de l'Amiodarona i el Metimazol ha afectat de forma greu el mecanisme de retroalimentació positiva de la síntesi dels TRs. Al bloquejar l'acció de la TPO i reduir la concentració de T3 i T4, el sistema ha disminuït de forma dràstica el nombre de TR a nivell cel·lular, tot i l'augment de iode circulat derivat de l'administració d'Amiodarona, posant de manifest que la concentració d'aquest element en sang no és un factor limitador per a la regulació tiroïdal.

6.3.4 Efectes del BPA en el Sistema Tiroïdal de *Danio rerio* (Article2).

Des de la seva introducció a principis de la dècada dels quaranta, les propietats dels productes plàstics han provocat un augment exponencial en la seva producció. Algunes d'aquestes propietats, com el seu baix cost de producció, baixa densitat o la impermeabilitat entre d'altres, els fan molt atractius sota el punt de vista industrial i comercial. Tot i això, aquestes propietats deriven d'una sèrie de característiques químiques que els converteixen en uns elements amb un gran potencial com a disruptors endocrins. La seva síntesi implica un procés de polimerització mitjançant el qual s'uneixen diversos monòmers formant polímers. Un dels principals monòmers utilitzats és el BPA, tant per produir els plàstics policarbonats, com a additiu d'altres plàstics com el PVC (*Secció 1.2.1*). La contaminació per BPA del medi es produeix per la seva alliberació als ecosistemes al llarg del procés de producció o bé per l'augment de la inestabilitat dels enllaços dels polímers quan aquests són sotmesos a calor. De fet, s'ha comprovat que al llarg de la seva vida útil, els polímers van alliberant una petita proporció de monòmers de BPA (*Secció 1.2.1*). Tot i que els seus mecanismes d'acció són encara desconeguts, diversos estudis han assenyalat aquest producte com un possible alterador del correcte desenvolupament mitjançant la seva interacció amb les vies metabòliques regulades per l'hormona tiroïdal.

Per tal de comprovar si el BPA és capaç d'interactuar amb sistema tiroïdal i analitzar l'efectivitat dels nostres biomarcadors, s'han realitzat 14 incubacions amb BPA en rangs de 0,1 a 4 mg/ml amb una concentració saturant (50nM) d'hormona T3, una altra de 5nM i una última sense ella. En les mostres exposades únicament a BPA l'expressió de *opn1/w1*, *hbae3* i *thra* no ha variat de forma estadísticament significativa en cap dels rangs de concentració de BPA i només el transcrit de *hba2* ha augmentat el seu nombre de còpies significativament ($p < 0,005$) en la concentració més alta de BPA (4mg/ml) (figura 59). D'altra banda els individus exposats a la concentració saturant de T3 + BPA han presentat un patró d'expressió igual als individus control incubats únicament amb T3 i cap dels gens estudiats ha sofert cap variació en el patró d'expressió atribuïble al canvi de concentració BPA administrat (1 a 4mg/ml). En canvi, els eleuteroembrions exposats a concentracions subsaturats de T3 (5nM) amb diferents concentracions de BPA (de 0,1 a 4mg/ml) han sofert un augment en el patró d'expressió en resposta a l'addició d'hormona T3 de forma gradual a l'augment de BPA, que ha actuat potenciant

l'efecte de canvi en l'expressió de les globines, l'opsina i el receptor d'hormona tiroïdal generat per l'addició de T3. De fet, els individus exposats a les concentracions màximes de BPA (4mg/ml) i 5nM d'hormona T3 han presentat una expressió estadísticament indistingible de la dels individus exposats a concentracions saturants de T3 (50nM). Per tant, aquestes dades han posat de manifest que el BPA actua com a agonista i potenciador de l'acció de T3, sempre i quan el sistema tiroïdal no es trobi saturat per les altes concentracions de T3 exògena administrades.

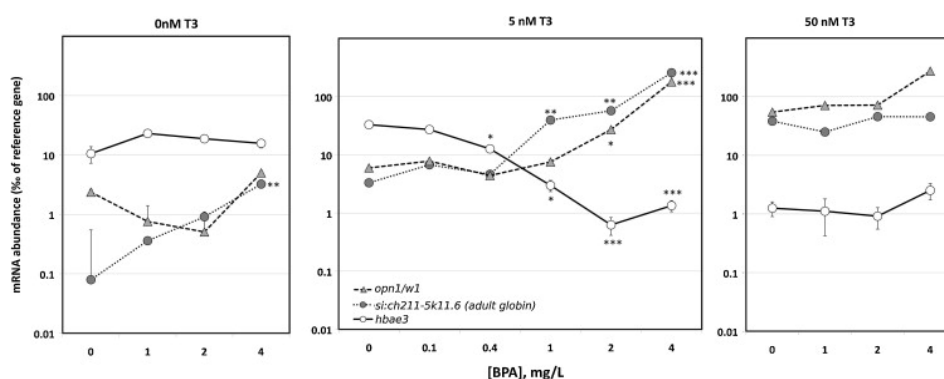


Figura 59. Canvis en la quantitat de mRNA en els gens *hbae3*, *hba2* i *opn1/w1* en *Danio rerio* de 5dpf's després de ser exposats a varies concentracions d'hormona T3 i BPA. Les barres corresponen a la desviació estàndard. Els asteriscs indiquen el valor de significança dels valors respecte els individus control. * $p > 0.05$, ** $p > 0.01$, *** $p < 0.001$.

Tot i que el BPA ha presentat efectes sinèrgics a l'actuar conjuntament amb T3, la variació del patró d'expressió dels nostres biomarcadors quan els individus són exposats únicament amb BPA invita a pensar que la seva acció no està únicament lligada a la seva interacció amb el sistema tiroïdal i la seva interacció amb els TRs. La major part dels receptors nuclears comparteixen, en major o menor mesura, una sèrie de coactivadors o corepresors i l'efecte potenciador del BPA sobre T3 pot tenir el seu origen en qualsevol d'aquests punts de trobada entre les diverses vies d'activació/repressió de la transcripció gènica. A la vegada, els resultats obtinguts mitjançant la plataforma d'Agilent han suggerit que el sistema del metabolisme retinòic presenta una alteració en els individus tractats únicament amb l'hormona T3. S'ha de tenir en compte que els TR es troben formant heterodímers amb el Receptor X Retinoic (RXR), per tant una possible interacció en aquest punt d'encreuament entre el sistema tiroïdal i retinòic podria ser la resposta als resultats observats en les mostres incubades amb hormona T3 + BPA. Per tal d'ampliar i esbrinar quins són els mecanismes d'interacció entre aquest dos sistemes s'han realitzat una sèrie d'exposicions addicionals amb 9-Cis-Retinoic (9cisRA) i s'ha inclòs el *cyp1a26* com a nou biomarcador. El

9cisRA és un derivat Vitamina A i el lligand natural del receptor heterodímic format pel Receptor de l'Àcid Retinoic (Rar) i RXR que permet la seva unió a les seqüències promotores denominades Elements de Resposta a l'Àcid Retinòic (RAREs) (Tallafuss, Hale et al. 2006). Aquest presenta una estreta regulació entre la seva síntesi i la seva degradació, i diversos estudis han demostrat la seva importància per a un correcte desenvolupament dels vertebrats, incloent el desenvolupament del sistema nerviós central i la formació de diversos òrgans (Gavalas and Krumlauf 2000). A la vegada, *cyp261a* codifica per un enzim que inactiva l'acció de l'àcid retinòic amb un important paper en el sistema de regulació de RXR.

A la figura 60 es pot observar el conjunt de resultats obtinguts a les anàlisis realitzats per l'estudi de la disrupció tiroïdal. Aquests mostren com *cyp1a26* ha augmentat la seva expressió en les mostres dels estudis realitzats amb la plataforma de microarrays d'Agilent, les tractades únicament amb hormona T3, amb BPA i amb 9-Cis-Retinòic, sent aquestes dues últimes les mostres on s'ha observat un major augment en el seu nombre de còpies de mRNA. Els individus tractats amb 9cisRA han presentat un patró d'expressió estadísticament indistingible de l'observat en els individus exposats únicament amb BPA, evidenciant una estreta relació entre l'acció del BPA i el receptor RXR. Una hipòtesi versemblant seria que l'acció del BPA es realitza a través de la seva interacció amb el receptor RXR que interfereix en l'acció dels TRs als que es troba units. Això provoca un efecte additiu en aquells individus tractats amb hormona T3 i BPA.

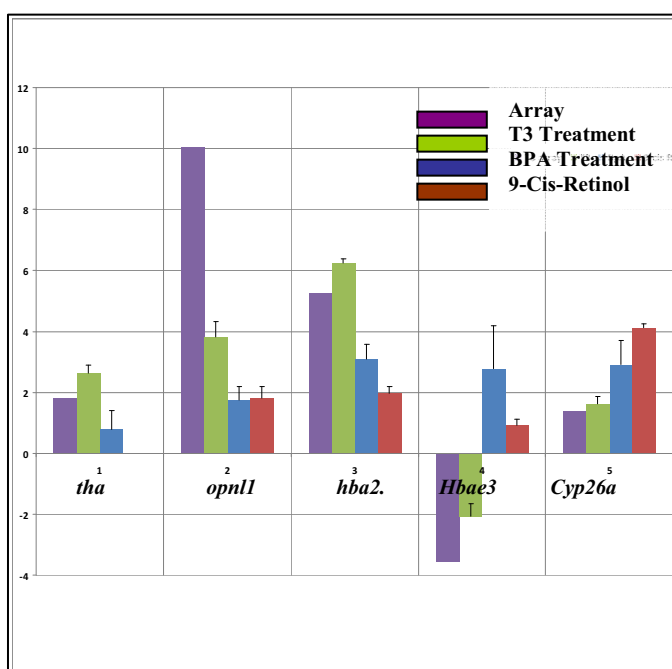


Figura 60. Canvis en la quantitat de mRNA en els gens *hbae3*, *hba2*, *tha*, *opn1/w1* i *Cyp26a* en Danio rerio de 5dpf's després de ser exposats a hormona T3, BPA i 9cisRA.

La interacció lligand-receptor està estretament relacionada amb l'estructura tridimensional dels receptors, derivada de la seva estructura terciària i quaternària, i que permetrà la unió entre el lligand i el receptor a través del seu domini d'activació. Per tant, decidim comparar l'estructura molecular del BPA amb la del 9cisRA. Mitjançant l'eina de visualització Jmol, el BPA ha presentat una estructura molt similar al 9cisRA i s'ha observat que, tot i que els resultats s'han realitzat mitjançant una simulació informàtica i no mitjançant càlculs amb valor estadístic, el BPA sembla tenir la capacitat física d'interactuar amb domini d'unió a lligand del receptor RXR.

Totes aquestes observacions ens han permès formular la hipòtesis que l'acció sinèrgica del BPA amb els efectes de l'hormona T3 sobre el sistema visual i hematopoètic són deguts a la seva interacció amb el sistema de regulació dels grups de receptors tipus RXR que es troben units al receptor TR. Aquesta suposant acció específica necessària, per raons desconegudes fins al moment, que els receptors TR es trobin en la seva forma activa, ja que en els casos on no s'hi troben, el BPA es comporta activant els gens relacionats amb el receptor RXR, fet que provoca un sinergisme amb l'acció dels TRs.

8.CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Els fangs tòxics dipositats a l'embassament de Flix han generat un impacte sobre la fauna aquàtica provocant un augment en l'expressió de *Cyp1a*, biomarcador gènic que indica la presència de contaminants tipus *dioxin like*. Aquest impacte es presenta també en les zones situades riu avall, demostrant que la disposició de productes tòxics no té una acció localitzada i són una contribució constant de contaminants al tram inferior del riu.
2. L'índex de MN en eritròcits perifèrics d'*Ardea purpurea* i *Cyprinus carpio* demostra l'impacte de la fauna a la zona de Flix per contaminants genotòxics. A més, la seva correlació amb l'elevada expressió gènica de *Cyp1a* a *Cyprinus carpio* conjuntament amb una elevada presència de Hg, HCBs i PCBs en el medi aquàtic i en les aus de l'embassament de Flix suggereix l'existència de l'efecte de biomagnificació d'aquests contaminants al llarg de la cadena tròfica.
3. El bioassaig no destructiu desenvolupat en aquesta tesi i que utilitza les escames de *Danio rerio* permet la detecció de metalls pesants, productes estrogènics i compostos tipus *dioxin like* amb temps d'incubació de 24 hores.
4. Amb els controls adequats, la metodologia d'amplificació del RNA missatger en massa s'ha demostrat com una tècnica molt útil per l'anàlisi de mostres amb molt poc contingut d'RNA.
5. L'estudi de les aigües del tram baix del riu Llobregat ha mostrat una clara contaminació de compostos *dioxin like* a la sortida de la potabilitzadora de Sant Joan Despí, així com un lleuger impacte per compostos estrogènics a les mostres de la Mina Pública. L'estudi també ha demostrat un impacte biològic baix o nul associat a la presència de metalls pesats en les mostres analitzades.
6. La monitorització diària del impacte de compostos tipus *dioxin like* ha demostrat una correlació positiva entre l'inducció de *cyp1a* als peixos exposats i els nivells de nitrits i d'un cert nombre de microcontaminants orgànics.

7. La correlació dels resultats de l'anàlisi de l'expressió de *cyp1a* amb la valoració de la toxicitat de les mostres no ha permès relacionar la presència de contaminants tòxics per als eleuteroembrions amb un augment de la seva expressió de *cyp1a*.

8. El disseny dels encebadors pels gens *fabp*, *mtp*, *tra*, *trab* i *doi2* ha permès estudiar els efectes subletals dels disruptors tiroïdals en els primers estadis del desenvolupament. El tractament amb Amiodarona i hormona T3 ha posat de manifest la relació existent entre el sistema tiroïdal i el metabolisme lipídic. Les dades evidencien un procés de retroalimentació positiva del sistema tiroïdal, ja que alguns gens implicat amb el mateix, *tra*, *trab* i *doi2*, es sobreexpressen en els individus tractats amb l'efector T3.

9. L'estudi del transcriptoma de *Danio rerio* ha demostrat el paper fonamental del sistema tiroïdal en el desenvolupament dels eleuteroembrions. El tractament amb hormona T3 exògena provoca un canvi dosi dependent en l'expressió temporal de determinats gens íntimament lligats al desenvolupament suggerint un avanç temporal cap a la transició larvària. A més, aquest estudi ha permès dissenyar encebadors específics per validar, ampliar i afinar els resultats obtinguts amb la plataforma d'hibridació mitjançant qRT-PCR

10. L'anàlisi dels efectes de l'Amiodarona i el Metimazol mitjançant els encebadors dissenyats en el punt anterior ha demostrat que, actuant conjuntament, afecten negativament el mecanisme de retroalimentació positiva del sistema tiroideu.

11. El BPA actua de forma sinèrgica amb l'hormona T3. L'anàlisi de les dades obtingudes que aquest efecte pot ser degut a la interacció del BPA amb un altre receptor nuclear, com el de l'àcid retinoic, encara que les dades actuals no permeten confirmar aquesta hipòtesi ara per ara.

9.BIBLIOGRAFIA

- [Buchanan], H. F. (1822). An account of the fishes found in the river Ganges and its branches, Edimburg & Londres.
- Aoki, Y. (2001). "Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters--what we have learned from Yusho disease." Environ Res **86**(1): 2-11.
- Aranda, A. and A. Pascual (2001). "Nuclear hormone receptors and gene expression." Physiol Rev **81**(3): 1269-1304.
- Arukwe, A. and K. Roe (2008). "Molecular and cellular detection of expression of vitellogenin and zona radiata protein in liver and skin of juvenile salmon (*Salmo salar*) exposed to nonylphenol." Cell Tissue Res **331**(3): 701-712.
- ATSDR (2009). "Case Studies in Environmental Medicine Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." 68.
- B.L Bayne, D. A. B., K Burns, D.R Dixon, A Ivanovici, D.A Livingstone, D.M Lowe, M.N Moore, A.R.D Stebbing and J Widdings, (1985). The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals. New York, Praeger.
- Baird, W. M., L. A. Hooven, et al. (2005). "Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action." Environ Mol Mutagen **45**(2-3): 106-114.
- Balbach J, S. (2000). Proline isomerization and its catalysis in protein folding. Oxford, Oxford University Press.
- Barata, C., M. C. Fabregat, et al. (2010). "Blood biomarkers and contaminant levels in feathers and eggs to assess environmental hazards in heron nestlings from impacted sites in Ebro basin (NE Spain)." Environ Pollut **158**(3): 704-710.
- Beard, J. (2006). "DDT and human health." Sci Total Environ **355**(1-3): 78-89.
- Beard, J., S. Marshall, et al. (2000). "1,1,1-trichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)-ethane (DDT) and reduced bone mineral density." Arch Environ Health **55**(3): 177-180.
- Beard, J., T. Sladden, et al. (2003). "Health impacts of pesticide exposure in a cohort of outdoor workers." Environ Health Perspect **111**(5): 724-730.
- Belanger, S. E., E. K. Balon, et al. "Saltatory ontogeny of fishes and sensitive early life stages for ecotoxicology tests." Aquat Toxicol **97**(2): 88-95.
- Belanger, S. E., E. K. Balon, et al. (2010). "Saltatory ontogeny of fishes and sensitive early life stages for ecotoxicology tests." Aquat Toxicol **97**(2): 88-95.
- Bern, H. A., K. T. Mills, et al. (1983). "Critical period for neonatal estrogen exposure in occurrence of mammary gland abnormalities in adult mice." Proc Soc Exp Biol Med **172**(2): 239-242.
- Bianco, A. C. and B. W. Kim (2006). "Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action." J Clin Invest **116**(10): 2571-2579.
- Boas, M., U. Feldt-Rasmussen, et al. (2006). "Environmental chemicals and thyroid function." Eur J Endocrinol **154**(5): 599-611.
- Boronat, S. G.-R., N.; Fonts, R.; Fernandez, P.; Grimalt, J.O.; Pina, B (2009). "Biological activity of aryl hydrocarbon receptor ligands in sediments from remote European Lakes." Freshwater Biology **54**: 2543-2554.
- Brix, R., C. Postigo, et al. "Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants." Anal Bioanal Chem **396**(3): 1301-1309.
- Brix, R., C. Postigo, et al. (2010). "Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European river basin and an evaluation of their importance as priority pollutants." Anal Bioanal Chem **396**(3): 1301-1309.
- Bro-Rasmussen, F. (1996). "Contamination by persistent chemicals in food chain and human health." Sci Total Environ **188 Suppl 1**: S45-60.

- Brownlie, A., C. Hersey, et al. (2003). "Characterization of embryonic globin genes of the zebrafish." *Dev Biol* **255**(1): 48-61.
- Brunton, L. (2010). Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Mc Graw Hill.
- Burbach, K. M., A. Poland, et al. (1992). "Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(17): 8185-8189.
- Buteau-Lozano, H., G. Velasco, et al. (2008). "Xenoestrogens modulate vascular endothelial growth factor secretion in breast cancer cells through an estrogen receptor-dependent mechanism." *J Endocrinol* **196**(2): 399-412.
- Campana I., M., A. Panzeri I., et al. (2003). "Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin " *Genet. Mol. Biol.* **26**(1).
- Capo Martí, M. (1999). Principios de Ecotoxicología, tebar.
- Carrier, G., M. Bouchard, et al. (2001). "A toxicokinetic model for predicting the tissue distribution and elimination of organic and inorganic mercury following exposure to methyl mercury in animals and humans. II. Application and validation of the model in humans." *Toxicol Appl Pharmacol* **171**(1): 50-60.
- Castells, X. E. (2005). Contaminantes orgánicos persistentes (COP's). Tratamiento y valorización energética de residuos, Ediciones Díaz de Santos.
- Céspedes, R., S. Lacorte, et al. (2005). "Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain)." *Chemosphere* **61**(11): 1710-1719.
- Coleman, J. E. (1992). "Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins." *Annu Rev Biochem* **61**: 897-946.
- Cotin, J., M. Garcia-Tarrason, et al. (2012). "Are the toxic sediments deposited at Flix reservoir affecting the Ebro river biota? Purple heron eggs and nestlings as indicators." *Ecotoxicology* **21**(5): 1391-1402.
- Coumailleau, P., L. Poellinger, et al. (1995). "Definition of a minimal domain of the dioxin receptor that is associated with Hsp90 and maintains wild type ligand binding affinity and specificity." *J Biol Chem* **270**(42): 25291-25300.
- Crofton, K. M. (2008). "Thyroid disrupting chemicals: mechanisms and mixtures." *Int J Androl* **31**(2): 209-223.
- Cui, X. and G. A. Churchill (2003). "Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments." *Genome Biol* **4**(4): 210.
- Cunha, G. C. and B. van Ravenzwaay (2005). "Evaluation of mechanisms inducing thyroid toxicity and the ability of the enhanced OECD Test Guideline 407 to detect these changes." *Arch Toxicol* **79**(7): 390-405.
- Chan, F. Y., J. Robinson, et al. (1997). "Characterization of adult alpha- and beta-globin genes in the zebrafish." *Blood* **89**(2): 688-700.
- Charles B. Kimmel, W. W. B., Seth R. Kimmel, Bonnie Ullmann, Thomas F. Schilling (1995). "Stages of Embryonic Development of the Zebrafish." *Developmental Dynamics*(203): 253-310
- Cherian, M. G., A. Jayasurya, et al. (2003). "Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis." *Mutat Res* **533**(1-2): 201-209.
- Choi, C. Y., K. W. An, et al. (2007). "Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish, *Carassius auratus*." *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **145**(4): 595-600.
- Damásio J, T. R., Teixidó E, Rieradevall M, Prat N, Riva MC, Soares AM, Barata C. (2008). "Combined use of *Daphnia magna* in situ bioassays, biomarkers and

- biological indices to diagnose and identify environmental pressures on invertebrate communities in two Mediterranean urbanized and industrialized rivers (NE Spain). Aquat Toxicol **30**(87): 310-320.
- Daniel, V., W. Huber, et al. (2002). "Associations of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) 4.4 and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) 4.4 blood levels with plasma IL-4." Arch Environ Health **57**(6): 541-547.
- Danielson, P. (2001). "The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans." Curr Drug Metab **3**(6): 561-597.
- De Luca-Abbott, S. B., B. S. Wong, et al. (2001). "Review of effects of water pollution on the breeding success of waterbirds, with particular reference to ardeids in Hong Kong." Ecotoxicology **10**(6): 327-349.
- Dechaud, H., C. Ravard, et al. (1999). "Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG)." Steroids **64**(5): 328-334.
- Denison, M. S. and S. Heath-Pagliuso (1998). "The Ah receptor: a regulator of the biochemical and toxicological actions of structurally diverse chemicals." Bull Environ Contam Toxicol **61**(5): 557-568.
- Denison, M. S., A. Pandini, et al. (2002). "Ligand binding and activation of the Ah receptor." Chem Biol Interact **141**(1-2): 3-24.
- Derfoul, A., F. J. Lin, et al. (2003). "Estrogenic endocrine disruptive components interfere with calcium handling and differentiation of human trophoblast cells." J Cell Biochem **89**(4): 755-770.
- Diaz-Cruz, M. S., M. J. Lopez de Alda, et al. (2003). "Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS)." J Mass Spectrom **38**(9): 917-923.
- Dixit, S. G., R. G. Tirona, et al. (2005). "Beyond CAR and PXR." Curr Drug Metab **6**(4): 385-397.
- Dluzen, D. E. and J. L. McDermott (2004). "Developmental and genetic influences upon gender differences in methamphetamine-induced nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity." Ann N Y Acad Sci **1025**: 205-220.
- Eales, D. G. C. a. J. G. (1996). "Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish " Reviews in Fish Biology and Fisheries **6**(2): 165-200.
- Eckert (2004). Fisiología Animal (Mecanismos y Adaptaciones), McGraw-Hill.
- Eriksson, P. and U. Talts (2000). "Neonatal exposure to neurotoxic pesticides increases adult susceptibility: a review of current findings." Neurotoxicology **21**(1-2): 37-47.
- Falck, F., Jr., A. Ricci, Jr., et al. (1992). "Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer." Arch Environ Health **47**(2): 143-146.
- Fernandez, M. A., C. Alonso, et al. (1999). "Occurrence of organochlorine insecticides, PCBs and PCB congeners in waters and sediments of the Ebro River (Spain)." Chemosphere **38**(1): 33-43.
- Fetzer, J. (2000). The Chemistry and Analysis of the Large Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Mew York, Wiley.
- Flamant, F. and J. Samarut (2003). "Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice." Trends Endocrinol Metab **14**(2): 85-90.
- Fleisch, V. C. and S. C. Neuhauss (2006). "Visual behavior in zebrafish." Zebrafish **3**(2): 191-201.
- Gavalas, A. and R. Krumlauf (2000). "Retinoid signalling and hindbrain patterning." Curr Opin Genet Dev **10**(4): 380-386.

- Gibson, U. E., C. A. Heid, et al. (1996). "A novel method for real time quantitative RT-PCR." *Genome Res* **6**(10): 995-1001.
- Gros, M., M. Petrovic, et al. (2006). "Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters." *Talanta* **70**(4): 678-690.
- H. Lamborg, F. F., J. O'Donell and T. Torgersen (2002). "A non-steady-state compartmental model of global-scale mercury biogeochemistry with interhemispheric atmospheric gradients." *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **66**(7): 1105-1118.
- Haffter, P. and C. Nusslein-Volhard (1996). "Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish." *Int J Dev Biol* **40**(1): 221-227.
- Halden (2010). "Plastics and health risks." *Annu Rev Public Health* **31**: 174-191.
- Hanneman, E. and M. Westerfield (1989). "Early expression of acetylcholinesterase activity in functionally distinct neurons of the zebrafish." *J Comp Neurol* **284**(3): 350-361.
- Haq, F., M. Mahoney, et al. (2003). "Signaling events for metallothionein induction." *Mutat Res* **533**(1-2): 211-226.
- Harvey, C. B. and G. R. Williams (2002). "Mechanism of thyroid hormone action." *Thyroid* **12**(6): 441-446.
- Heimeier, R. A., B. Das, et al. (2009). "The xenoestrogen bisphenol A inhibits postembryonic vertebrate development by antagonizing gene regulation by thyroid hormone." *Endocrinology* **150**(6): 2964-2973.
- Helfman, G. S., B.B. Collette y D.E. Facey (1997). *The Diversity of Fishes*, Blackwell Science.
- Heller, R. F., N. E. Miller, et al. (1981). "Associations between sex hormones, thyroid hormones and lipoproteins." *Clin Sci (Lond)* **61**(5): 649-651.
- Hoppichler, F., C. Sandholzer, et al. (1995). "Thyroid hormone (fT4) reduces lipoprotein(a) plasma levels." *Atherosclerosis* **115**(1): 65-71.
- Hu, N., D. Sedmera, et al. (2000). "Structure and function of the developing zebrafish heart." *Anat Rec* **260**(2): 148-157.
- Icardo, J. M., E. Colvee, et al. (1999). "Bulbus arteriosus of the antarctic teleosts. I. The white-blooded *Chionodraco hamatus*." *Anat Rec* **254**(3): 396-407.
- Ikeda, M., Z. W. Zhang, et al. (2000). "Urban population exposure to lead and cadmium in east and south-east Asia." *Sci Total Environ* **249**(1-3): 373-384.
- Ikezuki, Y., O. Tsutsumi, et al. (2002). "Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure." *Hum Reprod* **17**(11): 2839-2841.
- Jouko Tuomisto, T. V., Jouni T. Tuomisto (2011). *Synopsis on Dioxins and PCBs*. Helsinki, National Institute for Health and Welfare.
- Kagi, J. H. and A. Schaffer (1988). "Biochemistry of metallothionein." *Biochemistry* **27**(23): 8509-8515.
- Kang, I. J., H. Yokota, et al. (2002). "Effects of bisphenol a on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)." *Environ Toxicol Chem* **21**(11): 2394-2400.
- Kang, J. H., K. Kito, et al. (2003). "Factors influencing the migration of bisphenol A from cans." *J Food Prot* **66**(8): 1444-1447.
- Kerper, L. E., N. Ballatori, et al. (1992). "Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier." *Am J Physiol* **262**(5 Pt 2): R761-765.
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, et al. (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish." *Dev Dyn* **203**(3): 253-310.

- Kimmel, C. B., R. M. Warga, et al. (1994). "Cell cycles and clonal strings during formation of the zebrafish central nervous system." *Development* **120**(2): 265-276.
- Klinge, C. M., D. L. Bodenner, et al. (1997). "Binding of type II nuclear receptors and estrogen receptor to full and half-site estrogen response elements in vitro." *Nucleic Acids Res* **25**(10): 1903-1912.
- Kondo Y, W. E., Michalska AE, Choo KH, Lazo JS. (1995). "Metallothionein null cells have increased sensitivity to anticancer drugs." *Cancer Res* **55**(2021–2023).
- Kretschmer, X. C. and W. S. Baldwin (2005). "CAR and PXR: xenosensors of endocrine disrupters?" *Chem Biol Interact* **155**(3): 111-128.
- Kruger, R., M. Sharma, et al. (2011). "A large-scale genetic association study to evaluate the contribution of Omi/HtrA2 (PARK13) to Parkinson's disease." *Neurobiol Aging* **32**(3): 548 e549-518.
- Kuiper, G. G., B. Carlsson, et al. (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." *Endocrinology* **138**(3): 863-870.
- Kuruto-Niwa, R., Y. Tateoka, et al. (2007). "Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum." *Chemosphere* **66**(6): 1160-1164.
- Lavado, R., R. Thibaut, et al. (2004). "First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River." *Toxicol Appl Pharmacol* **196**(2): 247-257.
- Lazo, J. S., Y. Kondo, et al. (1995). "Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes." *J Biol Chem* **270**(10): 5506-5510.
- Lehane, D. B., N. McKie, et al. (1999). "Cloning of a fragment of the osteonectin gene from goldfish, *Carassius auratus*: its expression and potential regulation by estrogen." *Gen Comp Endocrinol* **114**(1): 80-87.
- Linney, E., A. Perz-Edwards, et al. "Identification and characterization of a functional zebrafish smrt corepressor (ncor2)." *Gene* **486**(1-2): 31-36.
- Liu, Y. W., L. J. Lo, et al. (2000). "Temporal expression and T3 induction of thyroid hormone receptors alpha1 and beta1 during early embryonic and larval development in zebrafish, *Danio rerio*." *Mol Cell Endocrinol* **159**(1-2): 187-195.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, et al. (1980). "The molecular genetics of human hemoglobins." *Annu Rev Genet* **14**: 145-178.
- Martino, E., L. Bartalena, et al. (2001). "The effects of amiodarone on the thyroid." *Endocr Rev* **22**(2): 240-254.
- Maruyama, K., S. Yasumasu, et al. (2002). "Characterization and expression of embryonic and adult globins of the teleost *Oryzias latipes* (medaka)." *J Biochem* **132**(4): 581-589.
- MassDep (2005). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)
- Mazzeffi, M. A., H. M. Lin, et al. "Hypothyroidism and the risk of lower extremity arterial disease." *Vasc Health Risk Manag* **6**: 957-962.
- McCarthy, J. F. S., L.R. (1990). Biomarkers of Environment Contamination, Lewis Publ.
- McKenna, N. J., R. B. Lanz, et al. (1999). "Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology." *Endocr Rev* **20**(3): 321-344.
- Menon, A. G. K. (1999). "Check list - fresh water fishes of India. *Rec. Zool. Surv. India.*" *Misc. Publ., Occas. Pap*(175): 366.
- Menuet, A., E. Pellegrini, et al. (2002). "Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions." *Biol Reprod* **66**(6): 1881-1892.

- Meucci, V. and A. Arukwe (2006). "The xenoestrogen 4-nonylphenol modulates hepatic gene expression of pregnane X receptor, aryl hydrocarbon receptor, CYP3A and CYP1A1 in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*)." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **142**(1-2): 142-150.
- Meyer, B. K., M. G. Pray-Grant, et al. (1998). "Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity." Mol Cell Biol **18**(2): 978-988.
- Milbrath, M. O., Y. Wenger, et al. (2009). "Apparent half-lives of dioxins, furans, and polychlorinated biphenyls as a function of age, body fat, smoking status, and breast-feeding." Environ Health Perspect **117**(3): 417-425.
- Miyazaki, W., T. Iwasaki, et al. (2004). "Polychlorinated biphenyls suppress thyroid hormone receptor-mediated transcription through a novel mechanism." J Biol Chem **279**(18): 18195-18202.
- Miyazaki, W., T. Iwasaki, et al. (2008). "Identification of the functional domain of thyroid hormone receptor responsible for polychlorinated biphenyl-mediated suppression of its action in vitro." Environ Health Perspect **116**(9): 1231-1236.
- Mueller, S. O. (2004). "Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods." Anal Bioanal Chem **378**(3): 582-587.
- Mugii, S., H. Hanada, et al. (2009). "[Clinical significance of apolipoprotein B-48 (apoB-48) in patients with thyroid disease]." Rinsho Byori **57**(11): 1058-1063.
- Navarro, A., L. Quiros, et al. (2009). "Physiological responses to mercury in feral carp populations inhabiting the low Ebro River (NE Spain), a historically contaminated site." Aquat Toxicol **93**(2-3): 150-157.
- Nigam, S. K., A. B. Karnik, et al. (1986). "Serum hexachlorocyclohexane residues in workers engaged at a HCH manufacturing plant." Int Arch Occup Environ Health **57**(4): 315-320.
- Nilsson, S., S. Makela, et al. (2001). "Mechanisms of estrogen action." Physiol Rev **81**(4): 1535-1565.
- Noguerol, T. N., S. Boronat, et al. (2006). "Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays." Anal Bioanal Chem **385**(6): 1012-1019.
- Nriagu, J. O. (1989). "A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals." Nature(338): 47-48.
- Nusse, M., W. Beisker, et al. (1994). "Measurement of micronuclei by flow cytometry." Methods Cell Biol **42 Pt B**: 149-158.
- O'Halloran, T. (1993). "Transition metals in control of gene expression." Science(261): 715-725.
- Paffett-Lugassy, N., N. Hsia, et al. (2007). "Functional conservation of erythropoietin signaling in zebrafish." Blood **110**(7): 2718-2726.
- Palmiter, R. D. (1994). "Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(4): 1219-1223.
- Patrick, L. (2009). "Thyroid disruption: mechanism and clinical implications in human health." Altern Med Rev **14**(4): 326-346.
- Pfaffl, M. W. (2004). Michael W. Pfaffl, International University Line.
- Poland, A. and J. C. Knutson (1982). "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity." Annu Rev Pharmacol Toxicol **22**: 517-554.

- Power, D. M., L. Llewellyn, et al. (2001). "Thyroid hormones in growth and development of fish." *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **130**(4): 447-459.
- Prieur, X., T. Huby, et al. (2005). "Thyroid hormone regulates the hypotriglyceridemic gene APOA5." *J Biol Chem* **280**(30): 27533-27543.
- Purkey, H. E., S. K. Palaninathan, et al. (2004). "Hydroxylated polychlorinated biphenyls selectively bind transthyretin in blood and inhibit amyloidogenesis: rationalizing rodent PCB toxicity." *Chem Biol* **11**(12): 1719-1728.
- Quaife, C. J., S. D. Findley, et al. (1994). "Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia." *Biochemistry* **33**(23): 7250-7259.
- Quiros, L., D. Raldua, et al. (2007). "A noninvasive test of exposition to toxicants: quantitative analysis of cytochrome P4501A expression in fish scales." *Environ Toxicol Chem* **26**(10): 2179-2186.
- Quiros, L., X. Ruiz, et al. (2008). "Analysis of micronucleated erythrocytes in heron nestlings from reference and impacted sites in the Ebro basin (N.E. Spain)." *Environ Pollut* **155**(1): 81-87.
- Rasanen, L. and M. Mutanen (1995). "Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men." *Circulation* **92**(8): 2355-2356.
- Rice, D. C., R. Schoeny, et al. (2003). "Methods and rationale for derivation of a reference dose for methylmercury by the U.S. EPA." *Risk Anal* **23**(1): 107-115.
- Rogan, W. J. and A. Chen (2005). "Health risks and benefits of bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT)." *Lancet* **366**(9487): 763-773.
- Rotllant J, R. B., Guerreiro PM, Fernandes H, Canario AV, Power DM. (2005). "Calcium mobilization from fish scales is mediated by parathyroid hormone related protein via the parathyroid hormone type 1 receptor." *Regul Pept.* **132**(1-3): 33-40.
- Saszik, S. and J. Bilotta (1999). "Effects of abnormal light-rearing conditions on retinal physiology in larvae zebrafish." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**(12): 3026-3031.
- Sato, M. and M. Kondoh (2002). "Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals." *Tohoku J Exp Med* **196**(1): 9-22.
- Schonfelder, G., W. Wittfoht, et al. (2002). "Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit." *Environ Health Perspect* **110**(11): A703-707.
- Seiwa, C., J. Nakahara, et al. (2004). "Bisphenol A exerts thyroid-hormone-like effects on mouse oligodendrocyte precursor cells." *Neuroendocrinology* **80**(1): 21-30.
- Shi, Y. B., J. Wong, et al. (1996). "Tadpole competence and tissue-specific temporal regulation of amphibian metamorphosis: roles of thyroid hormone and its receptors." *Bioessays* **18**(5): 391-399.
- Shimada, N. and K. Yamauchi (2004). "Characteristics of 3,5,3'-triiodothyronine (T3)-uptake system of tadpole red blood cells: effect of endocrine-disrupting chemicals on cellular T3 response." *J Endocrinol* **183**(3): 627-637.
- Singh G, K. T., Spencer WF, Dhankar JS. (1991). "Dissipation of some organochlorine insecticides in cropped and uncropped soil." *70 3(Environ Pollut.)*: 219-239.
- Sire, J. Y. and M. A. Akimenko (2004). "Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (shh) expression in the zebrafish (*Danio rerio*)." *Int J Dev Biol* **48**(2-3): 233-247.

- Spence, R., M.K. Fatema, S. Ellis, Z.F. Ahmed and C. Smitz (2007). "Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh." *J. Fish Biol*(71): 304-309.
- Staples, C. A., A. Tilghman Hall, et al. "Early life-stage and multigeneration toxicity study with bisphenol A and fathead minnows (*Pimephales promelas*)." *Ecotoxicol Environ Saf* **74**(6): 1548-1557.
- Stegeman, J. J., B. R. Woodin, et al. (1990). "Structure, function and regulation of cytochrome P-450 forms in fish." *Biochem Soc Trans* **18**(1): 19-21.
- Steve E Lindberg, H. Z., Alan F Vettec, Mae S Gustin, Mark O Barnett, Todd Kuiken (2002). "Dynamic flux chamber measurement of gaseous mercury emission fluxes over soils: Part 2—effect of flushing flow rate and verification of a two-resistance exchange interface simulation model." *Atmospheric Environment* **36**(5): 847–859.
- Takechi, M. and S. Kawamura (2005). "Temporal and spatial changes in the expression pattern of multiple red and green subtype opsin genes during zebrafish development." *J Exp Biol* **208**(Pt 7): 1337-1345.
- Talwar, P. K. a. A. G. J. (1991). "Inland fishes of India and adjacent countries." **1**: 541.
- Tallafuss, A., L. A. Hale, et al. (2006). "Characterization of retinoid-X receptor genes *rxra*, *rxrba*, *rxrbb* and *rxrg* during zebrafish development." *Gene Expr Patterns* **6**(5): 556-565.
- Theo Colborn , D. D. a. J. P. M. (1991). *Our Stolen Future: Are We Threatening Our Fertility, Intelligence, and Survival?--A Scientific Detective Story*, Plume.
- Thisse, C., Thisse, B., Schilling, T.F., and Postlethwait, J.H. (1993). "Structure of the zebrafish *snail1* gene and its expression in wild-type, spadetail and no tail mutant embryos " *Development* **119**: 1203:12015.
- Tingaud-Sequeira, A., M. Andre, et al. (2004). "Expression patterns of three estrogen receptor genes during zebrafish (*Danio rerio*) development: evidence for high expression in neuromasts." *Gene Expr Patterns* **4**(5): 561-568.
- Van den Berg, M., L. Birnbaum, et al. (1998). "Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife." *Environ Health Perspect* **106**(12): 775-792.
- Van den Berg, M., L. S. Birnbaum, et al. (2006). "The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds." *Toxicol Sci* **93**(2): 223-241.
- van der Oost, R., J. Beyer, et al. (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review." *Environ Toxicol Pharmacol* **13**(2): 57-149.
- van Veizen, D., H. Langenkamp, et al. (2002). "Review: mercury in waste incineration." *Waste Manag Res* **20**(6): 556-568.
- Vandentorren, S., F. Zeman, et al. (2011). "Bisphenol-A and phthalates contamination of urine samples by catheters in the Elfe pilot study: implications for large-scale biomonitoring studies." *Environ Res* **111**(6): 761-764.
- Vieira, F. A., S. F. Gregorio, et al. "Skin healing and scale regeneration in fed and unfed sea bream, *Sparus auratus*." *BMC Genomics* **12**: 490.
- W.H.O. (2010) "Dioxins and their effects on human health." Fact Sheet.
- Wade MG, P. S., Finsson KW, Foster W, Younglai E, McMahon A, Cyr DG & Hughes C (2002). "Thyroid toxicity due to subchronic exposure to a complex mixture of 16 organochlorines, lead, and cadmium." *Toxicological Sciences*(67): 207–218.
- Walker, K. (1999). "Factors Influencing the Distribution of Lindane and Other Hexachlorocyclohexanes in the Environment." *Environ. Sci. Technol.* **33**(24): 4373–4378.

- WFD (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy.
- WHO (2007). Health risks of heavy metals from long-range transboundary air pollution, WHO.
- Willett, K. U., E.; Hites, R (1998). "Differential Toxicity and Environmental Fates of Hexachlorocyclohexane Isomers." Environ. Sci. Technol. **32**: 2197–2207.
- Wu, S. M., Y. D. Zheng, et al. (2008). "Expression of mt2 and smt-B upon cadmium exposure and cold shock in zebrafish (Danio rerio)." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **148**(2): 184-193.
- Xiaodong Li, J. H., Ping Yi, Robert A. Bambara, Russell Hilf, and Mesut Muyan (2004). "Single-Chain Estrogen Receptors (ERs) Reveal that the ER α / β Heterodimer Emulates Functions of the ER α Dimer in Genomic Estrogen Signaling Pathways." Mol Cell Biol **24**(17): 7681–7694.
- Xuereb, B., L. Bezin, et al. (2011). "Vitellogenin-like gene expression in freshwater amphipod Gammarus fossarum (Koch, 1835): functional characterization in females and potential for use as an endocrine disruption biomarker in males." Ecotoxicology **20**(6): 1286-1299.
- Zavacki AM, Y. H., Christoffolete MA, Aerts G, So E, Harney JW, Cheng SY, Larsen PR, Bianco AC. (2005). "Type 1 iodothyronine deiodinase is a sensitive marker of peripheral thyroid status in the mouse." Endocrinology **3**(146): 1568-1575.
- Zoeller, R. T. (2007). "Environmental chemicals impacting the thyroid: targets and consequences." Thyroid **17**(9): 811-817.