

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología

Evaluación del daño en el ADN y de los efectos moleculares y celulares de los nanoplásticos (NPs) de poliestireno (PS) en *Chironomus riparius*.

Celia Sabroso Martín

Villaviciosa de Odón, junio 2023

INFORMACIÓN DEL CENTRO DONDE SE HA REALIZADO EL TRABAJO:

La Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), fue fundada en 1972 y se trata de una universidad pública española, cuya sede central se encuentra en Madrid en los campus de Ciudad Universitaria y de Senda del Rey, aunque cuenta con numerosos centros asociados tanto en España como en el extranjero.

El presente trabajo fue llevado a cabo en el Grupo de Biología y Toxicología Ambiental del Departamento de Física Matemática y de Fluidos de la Facultad de Ciencias de la UNED. El propósito del este grupo es el monitoreo ambiental y la evaluación del riesgo ecotoxicológico de diferentes contaminantes emergentes de origen antropogénico. El objetivo es evaluar el daño a nivel molecular y celular en organismos centinela, lo que permitirá predecir los potenciales efectos adversos en las poblaciones, las comunidades y los ecosistemas.

Contenido

Resumen del trabajo	1
Introducción	2
Objetivos	5
Materiales y métodos	6
1. Preparación de los nanoplasticos.....	6
2. Mantenimiento de <i>C. riparius</i> en cultivo	6
3. Estudio de supervivencia.....	6
4. Exposición de las larvas a NP	7
5. Ensayo cometa.....	7
6. Cuantificación de los cometas	8
7. Extracción de ARN y cuantificación.....	8
7.1 Tratamiento del ARN con ADNasa libre de ARNasas	8
8. Síntesis de ADNc	9
9. Análisis de expresión mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR).....	9
10. Análisis de datos.....	10
Resultados y discusión	14
1. Estudio de supervivencia.....	14
2. Análisis de expresión tras la exposición de larvas de <i>C. riparius</i> a NPs de PS durante 24h	14
2.1. Estrés celular	14
2.2. Estrés oxidativo	18
2.3. Reparación del ADN	19
2.4. Sistema endocrino	22
2.5. Desarrollo	24
2.6. Proteína transportadora de oxígeno	26
2.7. Sistema inmune	27
3. Ensayo cometa.....	29
Conclusiones	31
Bibliografía:	33

“Evaluación del daño en el ADN y de los efectos moleculares y celulares de los nanoplásticos (NPs) de poliestireno (PS) en *Chironomus riparius*.”

Resumen del trabajo

Desde la década de 1950, la producción del plástico ha superado la de cualquier otro material, siendo únicamente el 9% de la producción mundial la que ha sido reciclada, por lo que la mayor parte ha terminado en vertederos o en el medio ambiente. Los nanoplasticos (NPs), se describen como partículas de material plástico de entre 0,001 y 0,1 μm . La toxicidad ambiental que estos NPs pueden producir tras su liberación al medio ambiente cada vez toma más relevancia. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar los efectos genotóxicos y citotóxicos que tienen los NPs de poliestireno (PS) en un organismo de referencia como bioindicador de la calidad del agua, como es *Chironomus riparius*. Para ello, se llevó a cabo un estudio de supervivencia, donde las larvas expuestas a diferentes concentraciones de NPs de PS durante 96h no vieron afectada su supervivencia. Las concentraciones empleadas en estos ensayos fueron similares a las medioambientales. Además, se analizó la actividad transcripcional de genes relacionados con las rutas de estrés celular (*hsp27*, *hsp60*, *hsp70* y *hsp90*), estrés oxidativo (*SODMn*), sistemas de reparación del ADN (*ATM*, *xrcc1*, *NLK* y *DECAY*), sistema endocrino (*EcR*, *E74*, *E93* Y *DRONC*), la respuesta en el desarrollo (*FKBP39*), transporte de oxígeno (*HbC*) y el sistema inmune (*proPO*). En todas las rutas estudiadas se observaron cambios en la expresión génica. Finalmente, se evaluó el daño genotóxico producido por los NPs de PS, mediante el ensayo cometa, que demostró que a mayor concentración de NPs se produjo un mayor daño genotóxico. Los resultados obtenidos en el presente estudio (Figura1) demuestran la toxicidad y el riesgo que los NPs de PS suponen para los ecosistemas acuáticos, y más concretamente para los invertebrados.

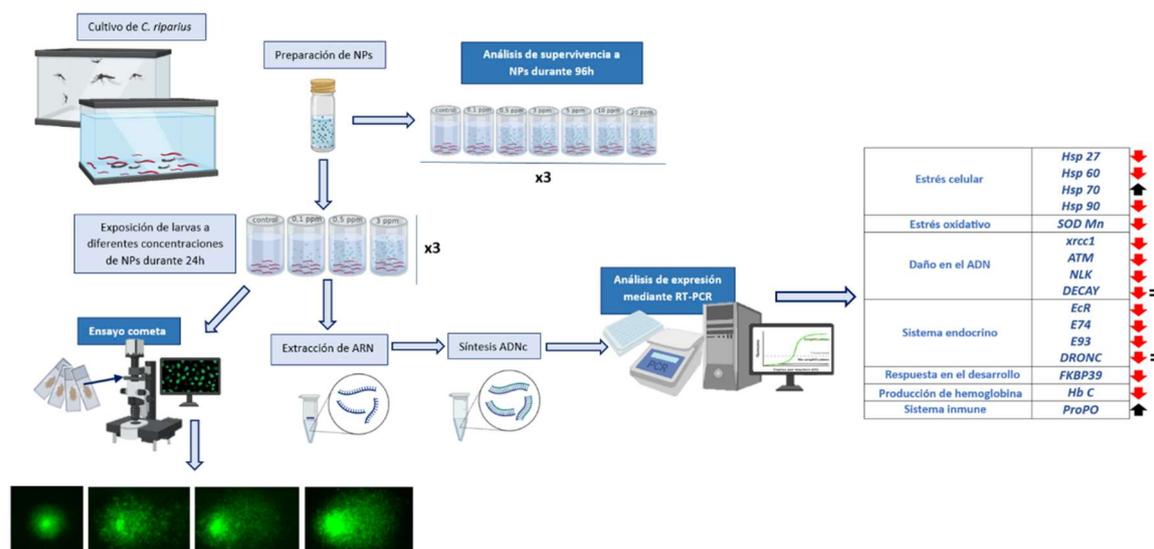


Figura 1. Resumen gráfico de los ensayos realizados y de los resultados obtenidos en este TFG. Imagen propia generada en biorender.

Introducción

En la actualidad la contaminación ambiental es uno de los problemas más graves y críticos del mundo, ya que está afectando a la fauna y a la flora del planeta.

Se denomina contaminación ambiental a la presencia de agentes físicos, químicos y biológicos, o una combinación de los mismos, en la atmósfera, agua o suelo. Su presencia en determinadas concentraciones resultan perjudiciales tanto para la salud humana, como para los seres vivos en general, además de causar daño a los bienes materiales y perjudicar el uso y disfrute del entorno o recurso natural que está siendo contaminado (Palacios Anzules & Moreno Castro, 2022).

Durante los siglos XIX, XX y XXI el desarrollo científico y tecnológico, junto con el crecimiento de la población humana, han repercutido de manera negativa sobre los ecosistemas. Las actividades antropogénicas han desencadenado fenómenos globales tales como el cambio climático, la destrucción de la capa de ozono, el efecto invernadero y la lluvia ácida. Estos fenómenos han impactado sobre los recursos naturales, incluida el agua; donde una alteración negativa de su cantidad y calidad traen consigo importantes prejuicios sobre la supervivencia de los seres vivos, entre los que se encuentra el ser humano. El cambio climático y la contaminación son los factores principales que afectan a la calidad y cantidad del agua disponible para el ser humano. A nivel global se estima que 2 millones de toneladas de desechos son arrojados diariamente al agua, donde destacan, efluentes químicos e industriales; fertilizantes y pesticidas; efluentes domésticos y plásticos (Quiroga et al., 2010).

El plástico es un material sintetizado desde hace 150 años, y su invención supuso una revolución por ser resistente, ligero y con bajo coste de producción. Desde la década de 1950, su producción mundial ha superado la de cualquier otro material, donde la mayor parte del plástico producido está diseñado para ser desechado tras un único uso. Por este motivo, los envases plásticos representan alrededor de la mitad de todo el plástico mundial. Únicamente el 9% de los 9.000 millones de toneladas de plástico producidas en el mundo han sido recicladas, por lo que la mayor parte ha terminado en basureros, vertederos y en el medio ambiente. Se prevé que si la situación actual de producción, consumo y las prácticas de gestión continúan a este ritmo, para el año 2050 habrá 12.000

millones de toneladas de basura plástica en vertederos y entornos naturales (MITECO, 2018).

Los nanoplásticos (NPs) se describen como partículas de material plástico cuyo tamaño se encuentra entre 0,001 y 0,1 μm (Koelmans, 2019). Estos nanomateriales (NMs) pueden ser clasificados según su origen en primarios o secundarios. Por un lado, los **NPs primarios**, son aquellos que son intencionadamente producidos en forma de nanopartículas y que son directamente liberados al medio ambiente con este tamaño. Por otro lado, los **NPs secundarios**, son aquellos que surgen de la degradación de materiales plásticos de mayor tamaño emitidos al ambiente, que a través de factores bióticos y abióticos (luz solar, temperatura, abrasión o degradación biológica) se fragmentan y desgastan hasta dar lugar a partículas que alcanzan la nanoescala (Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria (ACSA), 2019; Bergmann et al., 2015). Los NPs pueden tener diferentes estructuras, como nanoesferas o nanopelículas. Los polímeros plásticos más frecuentes en los ecosistemas acuáticos son las nanopartículas de polietileno (PE), poliamida (PA), polipropileno (PP) y el poliestireno (PS) (Mattsson et al., 2018).

La toxicidad ambiental que estos NPs pueden producir tras su liberación al medio ambiente, cada vez toma más relevancia. Esto se debe a que presentan propiedades características de las nanopartículas, cuyas propiedades físicas, químicas y eléctricas difieren considerablemente de las del propio material original. Los efectos tóxicos se deben principalmente, a la composición química, la forma y sobre todo a su pequeño tamaño. Estas nanopartículas presentan una mayor área superficial por unidad de masa, lo que las hace más reactivas, afectando así a su capacidad para interactuar con otros elementos y con componentes biológicos. Por este motivo, los NPs debido a sus propiedades únicas de nanoescala, presentan una mayor facilidad para atravesar barreras biológicas, penetrar a través de tejidos y acumularse en los órganos. Además, la elevada área superficial de estas nanopartículas, aumenta su reactividad, lo que a su vez eleva su biotoxicidad, pudiendo afectar al comportamiento y el metabolismo de los organismos (Mattsson et al., 2018; Nel et al., 2006).

El poliestireno (PS), es un polímero transparente compuesto por monómeros de estireno y se caracteriza por ser soluble en disolventes orgánicos, como ésteres, cetonas e hidrocarburos aromáticos. Es resistente a ácidos, sales, aceites minerales, ácidos orgánicos y alcoholes. Se trata de un plástico, sólido y duro, ampliamente utilizado para la fabricación de productos como envases transparentes, artículos de laboratorio y

material médico desechable. Además, la espuma de poliestireno es un excelente aislante térmico por lo que es utilizado en la construcción en techos y paredes, aunque también en congeladores y refrigeradores (Hwang et al., 2020). Las partículas de PS representan entorno al 10% de las partículas de plástico en el agua y sedimentos sin tratar. Sin embargo, pese a que representa una minoría de la contaminación plástica ambiental, la información relativa a su toxicidad es muy limitada (Qiao et al., 2022). Por lo que el uso de NP de PS para la realización de ensayos de ecotoxicidad en modelos animales que habitan en ecosistemas acuáticos, abre las puertas a la comprensión de los mecanismos de toxicidad que presentan estos NPs, permitiendo así conocer y predecir los posibles peligros para los seres vivos, incluido el hombre (Revel et al., 2018).

De entre los macroinvertebrados más utilizados en ensayos de ecotoxicidad acuática, destaca el díptero *C. riparius*, que es considerado un organismo de referencia como bioindicador de la calidad del agua por organismos internacionales como la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) (Weltje & Bruns, 2009). Esto es debido a que presentan una amplia distribución y son un elemento clave en la cadena trófica de los ecosistemas acuáticos. Existen varias pruebas estándar desarrolladas por la OCDE y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) (OCDE, 2010, 2011). Sin embargo, existe un vacío en el análisis de los mecanismos implicados en los efectos y la respuesta a los tóxicos. Se trata de un mosquito que presenta un ciclo de vida corto, constituido por cuatro etapas (Figura 2) (Armitage et al., 1995).

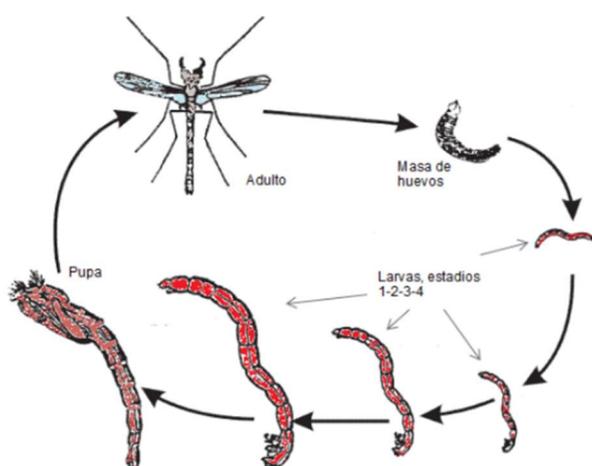


Figura 2: Ciclo de vida del díptero *Chironomus riparius* (Urien Crespo, 2017).

El ciclo vital de *C. riparius*, tiene una duración de tres a cuatro semanas en condiciones de cultivo de laboratorio, siendo la temperatura y la disponibilidad de alimento los factores más influyentes. Consta de las siguientes etapas (Figura 2):

1. **Embrión:** las puestas son depositados por las hembras en la superficie del agua, y pueden contener alrededor de 600 huevos que eclosionan en pocos días.
2. **Larva:** esta fase comprende cuatro estadios con una duración aproximada de una semana. Durante los tres primeros, las larvas construyen pequeños tubos con sedimentos, algas y fibras de seda secretadas a través de sus glándulas salivales. Estos conductos que construyen pueden acumular tóxicos, por lo que son relevantes desde un punto de vista ecotoxicológico. Las larvas del cuarto estadio generalmente son las elegidas para los ensayos de ecotoxicidad y suelen ser seleccionadas para estudiar los eventos moleculares debido a su gran tamaño en comparación con los demás. Además, es la etapa más activa metabólicamente ya que, durante el cuarto estadio, se producen varios acontecimientos del desarrollo, regulados por el sistema endocrino, que preparan al individuo para la pupación.
3. **Pupa:** presenta una duración de apenas unas horas y es el estadio intermedio entre larva y adulto.
4. **Adulto:** se caracteriza por ser el único estadio aéreo.

Objetivos

El objetivo de este estudio es conocer los efectos genotóxicos y citotóxicos de los NPs de PS en larvas del cuarto estadio de *C. riparius*. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Realizar el análisis de supervivencia en larvas de *C. riparius* tras la exposición a NPs de PS a diferentes concentraciones (similares a las ambientales) mediante su exposición durante 96 horas.
- Analizar los efectos de los NPs de PS en la actividad transcripcional de los genes relacionados con rutas de estrés celular, estrés oxidativo, mecanismos de reparación del ADN, el sistema endocrino, el desarrollo, el transporte de oxígeno y el sistema inmune.

- Analizar la genotoxicidad de los NPs de PS mediante el ensayo cometa y relacionarla con los cambios de expresión de genes involucrados en el mecanismo de reparación del ADN en *C. riparius*.

Materiales y métodos

1. Preparación de los nanoplásticos

Se adquirieron partículas de poliestireno comercial prístinas con un diámetro de 30 nm y 1,05 g/cm³ de densidad, de *Thermo Scientific*TM (Madrid, España), número de catálogo 5003 A. Los NPs se encontraban en una solución al 10% en agua con <2% de surfactante (SDS) para evitar la aglomeración. La solución patrón se diluyó a las concentraciones de trabajo en agua destilada, y el surfactante se diluyó lo suficiente como para no causar efecto (Martin Folgar et al., 2023). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, la solución patrón se sonicó durante 10 minutos antes de su uso. Las concentraciones de trabajo de los NPs se eligieron en base al análisis de supervivencia y estudios previos del grupo (Martin Folgar et al., 2023). Se eligieron concentraciones de 0,1, 0,5 y 3 ppm para evaluar la toxicidad subletal. También se eligieron estas concentraciones para imitar las que podrían encontrarse en el medio ambiente (Torres-Ruiz et al., 2021).

2. Mantenimiento de *C. riparius* en cultivo

La población empleada fue establecida a partir de larvas de *C. riparius* recolectadas de poblaciones naturales y se han mantenido en el laboratorio de la Facultad de Ciencias perteneciente a la UNED, según los protocolos estandarizados para test de toxicidad de la OCDE y la USEPA (OCDE, 2004; USEPA, 2000).

Las larvas fueron mantenidas en medio de cultivo compuesto de CaCl₂ 0,5 mM, NaCl 1 mM, MgSO₄ 1 mM, KH₂PO₄ 0,025 mM, NaHCO₃ 0,1 mM, y FeCl₃ 0,01 mM, alimentadas con comida para peces comercial (TetraMin, Tetra). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 18 °C, con aireación constante y ciclos de luz/oscuridad de 16/8h.

3. Estudio de supervivencia

Se seleccionaron larvas del cuarto estadio de *C. riparius* (Figura 2). Las larvas se situaron en 7 vasos de cristal (30 larvas por vaso), con 50 ml de medio de cultivo. El análisis se componía de un grupo control y seis tratamientos con NPs a diferentes

concentraciones: 0,1; 0,5; 3; 5; 10 y 20 ppm. El tiempo de exposición fue de 96h y durante el transcurso del experimento se les alimentó a las 48h de exposición. Se llevaron a cabo tres replicas experimentales.

4. Exposición de las larvas a NP

Para llevar a cabo los tratamientos con NPs de PS, se seleccionaron larvas del cuarto estadio de *C. riparius*. Las larvas se colocaron en 4 vasos de cristal (5 larvas por vaso), con 50 ml de medio de cultivo. El experimento se componía de un grupo control y tres tratamientos con NPs a diferentes concentraciones: 0,1, 0,5 y 3ppm. El tiempo de exposición fue de 24h y durante el transcurso del experimento no se les suministró alimento ni aireación. Se llevaron a cabo tres replicas experimentales.

5. Ensayo cometa

El ensayo cometa o electroforesis en gel de una única célula fue descrito por Singh y colaboradores en 1988. Esta técnica permite la detección de roturas de ADN de cadena sencilla y de cadena doble, sitios álcali lábiles, sitios de reparación del ADN por escisión y sitios de sobrecruzamiento del ADN, con la aproximación celular de ensayo citogenético (Singh et al., 1988).

Las larvas de *C. riparius* fueron expuestas durante 24h a las concentraciones de NPs y en las condiciones explicadas en el aparatado anterior, se llevaron a cabo 3 réplicas experimentales. Durante todo el experimento se mantuvieron en condiciones de oscuridad. A las 24h de exposición, se cortaron las larvas y se homogenizaron sobre un cedazo. El homogenizado se resuspendió en 800 μ L de tampón de suspensión (20 mM EDTA, DMSO 10%, PBS 1X) y se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm y 4°C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 250 μ L de tampón de suspensión. Seguidamente, se mezclaron 10 μ L de la suspensión celular con 100 μ L de agarosa de bajo punto de fusión al 1%. Se extendieron 100 μ L de la mezcla sobre un portaobjetos, y se dejaron gelificar durante 5 minutos a 4°C. Se lisaron las membranas celulares con tampón de lisis (10 mM Tris, 100 mM EDTA, 2,5 mM NaCl, 10% DMSO, 10% Triton X-100, pH 10) durante 1h a 4°C. Pasado el tiempo de lisado, se eliminó el tampón de lisis y se incubó con tampón alcalino (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, se llevó a cabo una electroforesis a 300 mA durante 25 minutos. Finalizada la electroforesis, se lavaron los portaobjetos con tampón de neutralización (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) 3 veces durante 5 minutos. Finalmente

se realizó un último lavado con etanol al 70% durante 5 minutos y las preparaciones se dejaron deshidratar a 45°C.

Para su visualización los portaobjetos se tiñeron con 100 µL de *SYBR® Gold Staining Solution* (Thermofisher) durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se lavaron con agua destilada y se deshidrataron a 45°C. Se observaron los portaobjetos empleando un microscopio de fluorescencia confocal Axiophot (Zeiss) con un sistema de epifluorescencia y equipado con una cámara CCD (Photometrics Cool Snap).

6. Cuantificación de los cometas

A partir de las fotografías obtenidas se cuantificaron alrededor de 50 células por tratamiento, obteniendo los diferentes parámetros del cometa empleando el programa Image J. Los parámetros seleccionados en este estudio para la evaluación del daño genotóxico fueron el porcentaje de ADN en la cola y el momento oliva.

7. Extracción de ARN y cuantificación

El ARN total se extrajo a partir de 5 larvas de *C. riparius* expuestas durante 24h a las diferentes concentraciones de NPs y también a partir de las larvas control sin exponer. Para ello se empleó el kit comercial de TRIzol (*Invitrogen*). Tras la exposición las larvas se conservaron a -80°C. Posteriormente se homogenizaron en 300 µL de TRIzol. Una vez homogenizadas, las larvas se congelaron y se descongelaron 3 veces y se centrifugaron a 10.000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Se descartó el pellet y se traspasó el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio. Después, se añadieron 60 µL de cloroformo, se agitó y se dejó reposar 3 minutos, y se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 15 minutos. La fase acuosa se traspasó a un nuevo tubo limpio y se añadió un volumen de isopropanol, se agitó y se dejó reposar 10 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugó 10.000 rpm a 4°C durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado de ARN se lavó con 300 µL de EtOH al 75% frío libre de ARNasas, se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, el precipitado se resuspendió en agua DEPC.

7.1 Tratamiento del ARN con ADNasa libre de ARNasas

El ARN se trató con ADNasa libre de ARNasas. Para ello, se preparó una mezcla de reacción que contenía 5 µL de Tampón 10 X (*Roche*), 1 µL de la enzima ADNasa libre de ARNasa (10 U/ µL) (*Roche*) y H₂O DEPC hasta alcanzar un volumen final de 50 µL. Se incubó a 37°C durante 1 hora y 30 minutos. Posteriormente, se añadieron 100 µL de H₂O DEPC y 150 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó a 10.000 rpm, 15 minutos a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se añadió a la columna *Phase*

lock gel (5 Prime) junto a un volumen de cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 12.000 rpm, 10 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se precipitó el ARN con un volumen de isopropanol. Para ello se agitó y se dejó reposar 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 rpm, 10 minutos a 4°C. Se descartó la fase acuosa y el ARN precipitado se lavó con EtOH 75% DEPC y se resuspendió en 50 µL de H₂O DEPC.

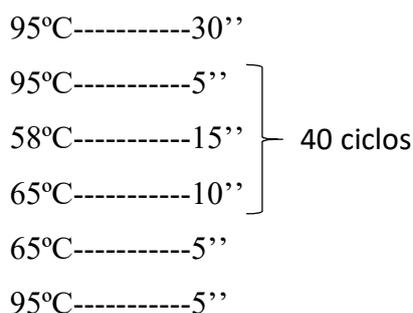
El ARN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría obteniéndose un rendimiento de extracción de entre 70 y 90 µg. El ARN se almacenó -80°C.

8. Síntesis de ADNc

Se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN extraído mediante una transcripción inversa, para ello se empleó la enzima M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) (*Invitrogen*), se siguieron las instrucciones de la casa comercial en un volumen final de 20 µL a partir de 500 ng de ARN total. Se llevó a cabo la preparación de la mezcla reacción 1 [1 µl Oligo dT (500 µg/ml), 500ng de ARN, 1 µl dNTPs (10mM) y H₂O DEPC hasta alcanzar un volumen final de 12 µL]. Una vez preparada la mezcla de reacción 1, se incubó 5 minutos a 65°C. Transcurrido el tiempo, se situó en hielo, para detener la reacción. A continuación, se añadió la mezcla de reacción 2 [4 µl Buffer 5X (*Invitrogen*), 2 µL DTT (0,1 M), 0,5 µL MMLV (200 U/µL) y H₂O DEPC hasta alcanzar un volumen final de mezcla de reacción 2 de 8 µL]. Se incubó a 37°C durante 50 minutos, y finalmente se inactivo la reacción a 70°C durante 15 minutos. El ADNc sintetizado se almacenó a -20°C.

9. Análisis de expresión mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR)

Los genes de interés fueron amplificados mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) a partir del ADNc sintetizado que servirá como molde para analizar el perfil de expresión del ARN mensajero (ARNm), empleando un termociclador *CFX96 RT-PCR system* (*Bio-Rad*). Los oligonucleótidos empleados se muestran en la tabla 1. Los oligonucleótidos se usaron a una concentración final de 10 µM. Se preparó una solución de dNTPs 10 mM y tampón de reacción 10X (sin MgCl₂) y se suplementó con 25 ng de ADNc, MgCl₂ 50 mM, 40 µL de ADN polimerasa (*Biotools DNA Polymerase* 1U/µL Ref. 10014) y 25 µL de Eva Green (*Biotium EvaGreen® Dye*, 20X in Water Ref. 31000). El volumen de reacción fue de 10 µL, y las placas utilizadas fueron placas multiwell (*Sarstedt*). Los genes de referencia seleccionados fueron GAPDH y la proteína ribosomal L13. El programa empleado consistió en:



10. Análisis de datos

El análisis estadístico de los datos para la búsqueda de diferencias significativas de las muestras tratadas respecto a las muestras control en cada uno de los parámetros del estudio, se llevó a cabo mediante la exposición de *C. riparius* a NPs a diferentes concentraciones, con 3 réplicas experimentales. Los niveles de expresión de ARNm de cada una de las muestras fueron normalizados frente a los genes de referencia GAPDH y rpL13 (Tabla 1), y el análisis estadístico se llevó a través del programa informático *IBM SPSS Statistics 27* empleando como método paramétrico ANOVA. Por otro lado, los parámetros (porcentaje de ADN en la cola y el momento oliva) obtenidos en el ensayo cometa, se normalizaron con respecto a las muestras control y para la evaluación de diferencias significativas se realizó el test de comparación múltiple de *Dunnnett's*. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos resultados con un *p*-valor <0,05, *p*-valor <0,01 y *p*-valor <0,001.

Nombre del gen	Símbolo del gen	Función	Eficiencia	Secuencia	Referencia
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>	Producción de energía	94,1%	F: GGTATTTTCATTGAATGATCACTTTG R: TAATCCTTGGATTGCATGTACTT	(Martínez-Paz et al., 2012)
Ribosomal protein L13	<i>rpL13</i>	Subunidad ribosomal	97,3%	F: ACCAGCTAGAAAAGCACCGTC R: ATGGGCATCTGACGATTGGG	(Morales et al., 2011)
Heat shock protein 90	<i>hsp90</i>	Respuesta al estrés	108,1%	F: AGGCTGAAGCTGACAAGAATG R: TCATGCGATAAATGCGAGCAG	(Carrasco-Navarro et al., 2021)
Heat shock protein 70	<i>hsp70</i>	Respuesta al estrés	102,8%	F: ACTTGAACCAGTTGAGCGT R: TTGCCACAGAAGAAATCTTG	(Morales et al., 2013)
Heat shock protein 27	<i>hsp27</i>	Respuesta al estrés	94,4%	F: TCAACACACAGGACCG R: ATCCTTTATTGGTGATTAATTATG	(Martínez-Paz et al., 2014)
Heat shock protein 60	<i>hsp60</i>	Respuesta al estrés	105%	F: TGCTGTCCTTAAAGTCGGTGG R: TCCACCACCAGCAACGATTC	(Martín-Folgar & Martínez-Guitarte, 2017)
X-ray repair cross complementing 1	<i>xrcc1</i>	Reparación del ADN. SSB/DSB	109,7%	F: GACGATTTGCATTGGATAGT R: ATCAACATATCGCCATCAG	(Aquilino et al., 2018a)
Ataxia-telangiectasia mutated	<i>ATM</i>	Reparación del ADN SSB	102%	F: ACATTTGGCGTAGATCAGGCA R: ACGAGATGCATCAAATCATGC	(Aquilino et al., 2018a)
<i>NEMO-like kinase</i>	<i>NLK</i>	Reparación del ADN. SSB	98,3%	F: CATCTCACCAGATCGTCTCT R: GAATTTATTTGATTATGCGGC	(Aquilino et al., 2018a)
Death executioner caspase related to Apopain/Yama	<i>DECAY</i>	Reparación del ADN. Apoptosis	97,9%	F: AAAGTGTTCCGATTATGGC R: TTCACACCAGTTAAAATCCAC	(Aquilino et al., 2018a)
Super oxide dismutase	<i>SODMn</i>	Estrés oxidativo	107,2%	F: AAGTCGCTGCTGTTGGAGTT R: TGGAACAAAGCCGGTTGTGG	(Carrasco-Navarro et al., 2021)
FK506-binding protein of 39 kDa	<i>FKBP39</i>	Desarrollo	100,2%	F: AGGCTGGGATATCGGACTCAT R: GTAAGCAAATGCAGGCGGG	(Carrasco-Navarro et al., 2021)
Death regulator Nedd2-like caspase	<i>DRONC</i>	Sistema endocrino (20-E)	99,3%	F: GAAATGTCACAGATTTCAAGTCC R: GTGAATATCGTAAGCATGTTCTG	(Martín-Folgar & Martínez-Guitarte, 2019)
Chironomus riparius ecdysone receptor	<i>EcR</i>	Sistema endocrino (20-E)	102,9%	F: TCTTCTCACGGCCATCGTCA R: GCTGCATCTTGTTCGCCAC	(Planelló et al., 2010)
Ecdysteroid-regulated gene E74	<i>E74</i>	Sistema endocrino (20-E)	93,5%	F: TCTTACTGAAACTTCTTCAAGATCG R: GCTTTGAGACAGCTTTGGAATCG	(Morales et al., 2013)
Ecdysone-induced protein 93F	<i>E93</i>	Sistema endocrino (20-E)	107,1%	F: CGAGAACCAGAAACCACAGCC R: GCGCTGCCATTGATGGATGATC	(Muñiz-González, Novo, et al., 2021)
Hemoglobin C	<i>Hb C</i>	Producción de hemoglobina	109,25%	F: AACGTGGCTTTGGAGGTATG R: GTTGGCAAGGATCTCGACTC	(Ha & Choi, 2008)
Prophenoloxidase	<i>ProPO</i>	Sistema inmune	108%	F: CTCGAACAGCACCTTTGTCTG R: CCATGAATCGTTCACGCCATC	(Muñiz-González & Martínez-Guitarte, 2020)

Tabla 1. Cebadores empleados para la amplificación del ADN a través de RT-PCR.

Resultados y discusión

1. Estudio de supervivencia

Los resultados obtenidos en el estudio de supervivencia tras 96h de exposición de las larvas del cuarto estadio de *C. riparius* a diferentes concentraciones de NPs de PS (0,1, 0,5, 3, 5, 10 y 20 ppm), no mostraron apenas mortalidad, presentando así una supervivencia superior al 90% (datos no mostrados). Por lo que se puede concluir que los NPs de PS no afectan a la supervivencia de las larvas.

Los tratamientos a bajas concentraciones de NPs de PS (0,1, 0,5 y 3 ppm) durante 24h, fueron seleccionados para la evaluación del daño genotóxico y los estudios de cambio de expresión génica, con el objetivo de identificar la respuesta temprana de los genes sensibles relacionados con diferentes rutas metabólicas.

2. Análisis de expresión tras la exposición de larvas de *C. riparius* a NPs de PS durante 24h

El análisis de la expresión génica de *C. riparius* se llevó a cabo mediante RT-PCR como se detalla en el apartado 8 de la sección de Materiales y Métodos, empleando como genes de referencia GAPDH y rpL13, ambos genes se expresan de manera constitutiva en la célula y están implicados en rutas de síntesis de energía y la síntesis de proteínas respectivamente.

Los genes de interés se analizaron y clasificaron según su función, en 6 grupos: estrés celular, estrés oxidativo, reparación del ADN, sistema endocrino, desarrollo, transporte de oxígeno y sistema inmune.

2.1. Estrés celular

Las proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*, HSPs), son una familia de proteínas altamente conservada presentes tanto en células eucariotas como en procariontas. Están implicadas en multitud de procesos fisiológicos. Los genes que codifican para las HSPs forman parte de un subconjunto de un grupo más grande de genes que codifican las chaperonas moleculares (Nollen & Morimoto, 2002). Estas proteínas, participan tanto en el plegamiento correcto de los péptidos nacientes, como evitando la acumulación celular de proteínas mal plegadas (Madrigal-Matute et al., 2009). Los niveles de expresión de las HSPs en condiciones normales son bajos. Sin embargo, su expresión aumenta bajo la presencia de factores como el aumento de temperatura, infecciones, hipoxia,

tumorigénesis, contaminantes, etc. En artrópodos, también son inducidos en presencia de factores ambientales estresantes, como la desecación y la presencia de metales pesados (Hoffmann et al., 2003; Parsell & Lindquist, 1993) y concretamente en *C. riparius* se ha evaluado la respuesta de las HSPs a diferentes xenobióticos como metales pesados (Cadmio), bisfenol (BPA, BPS, BPF), óxido de tributilestaño (TBTO), pentaclorofenol (PCP), ftalatos, polifenol, nanotubos de carbono (MWCNT), MPs y óxidos de grafeno (sGO, mlGO, lGO) (Carrasco-Navarro et al., 2021; Herrero et al., 2018; Martínez-Paz et al., 2019; Martín-Folgar, Esteban-Arranz, et al., 2023; Martín-Folgar & Martínez-Guitarte, 2017, 2019; Morales et al., 2020; Muñoz-González, Novo, et al., 2021; Park & Kwak, 2008). En insectos, las HSPs también están involucradas en algunos procesos biológicos importantes tales como, el crecimiento celular, la diferenciación, la diapausa, la apoptosis, la fluidez de membrana y la resistencia al hambre (Arrigo, 1998). Dado que la expresión de las enzimas HSPs son esenciales en el mantenimiento de la homeostasis celular, estas proteínas han sido propuestas como biomarcadores de biomonitoreo ambiental (Gupta et al., 2010).

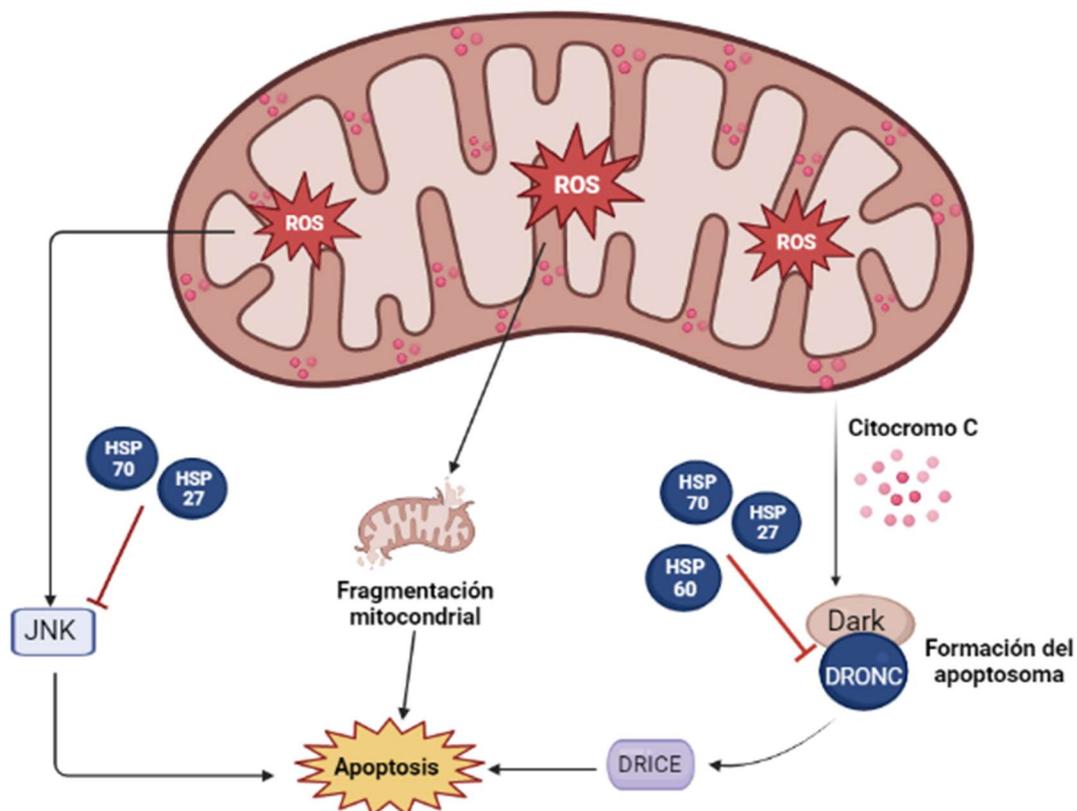


Figura 3. Esquema de las posibles acciones de las proteínas antiapoptóticas (HSP70, HSP27 y HSP60) cuyos genes han sido estudiados en la vía de la muerte celular programada. La actividad de la HSP27, la HSP70 y la HSP60 en diferentes puntos de la ruta pueden inhibir la apoptosis. JNK (proteína quinasa activada por estrés/quinasa N-terminal de Jun). Imagen propia generada en biorender.

Para el estudio del efecto que tienen los NPs de PS sobre el estrés celular de las larvas de *C. riparius* tras 24h de exposición, se eligieron los genes *hsp27*, *hsp60*, *hsp70* y *hsp90*. Algunas de sus funciones son:

- **HSP27:** está implicada en la termotolerancia y la proliferación celular. Además, de actuar como chaperona (Guerrero-Rojas & Guerrero-Fonsecaz, 2019). Se ha descrito la función de la proteína HSP27 como regulador de la apoptosis (Figura 3), ya que inactiva la cascada de caspasas, mediante su unión con la proteína equivalente a la caspasa 3 y el citocromo C liberado de las mitocondrias impidiendo la formación del apoptosoma (Wang et al., 2014a).
- **HSP60:** pertenece a la familia de chaperonas mitocondriales, aunque también se ha detectado su presencia en la membrana citoplasmática de algunas células. Participa en el transporte y plegamiento de proteínas desde el citoplasma hacia la matriz mitocondrial (Guerrero-Rojas & Guerrero-Fonsecaz, 2019). Además, se ha descrito la actividad antioxidante de la HSP60, participando en la defensa de las células frente al estrés oxidativo y la acción de los radicales libres. Esta proteína mitocondrial actúa afectando a la cadena respiratoria, y a la síntesis de ATP, limitando la liberación del citocromo C (Każmierczuk & Kiliańska, 2010).
- **HSP70:** se localiza en citoplasma y dentro de algunos orgánulos. Actúa como chaperona y colabora junto a HSP90 y otras chaperonas, al plegamiento correcto de los polipéptidos durante la traducción de los mismos, mediante su unión a segmentos hidrofóbicos. Además, participa en la translocación de los polipéptidos hacia los diferentes compartimentos celulares. Y a su vez colabora a la eliminación de proteínas defectuosas o dañadas mediante su interacción con el extremo C-terminal (proteína CHIP) de HSP70, ya que es una E3 ubiquitin ligasa (Guerrero-Rojas & Guerrero-Fonsecaz, 2019). Por otro lado, HSP70 media la inhibición de la muerte celular inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), además de modular la fosforilación de JNK inhibiendo así la apoptosis inducida estrés (Wang et al., 2014a).
- **HSP90:** es una de las proteínas más abundantes de la célula, se encuentra tanto en el citoplasma como en la superficie celular, e incluso se excreta extracelularmente. Participa en la regulación de más de 100 proteínas entre las que se encuentra P53, muchas de las proteínas que regula se caracterizan por ser mediadores de las transducción de señales y del control del ciclo celular. Por lo que la HSP90 ha sido

relacionada como una de las principales HSPs implicadas en el desarrollo y la progresión de tumores (Guerrero-Rojas & Guerrero-Fonseca, 2019).

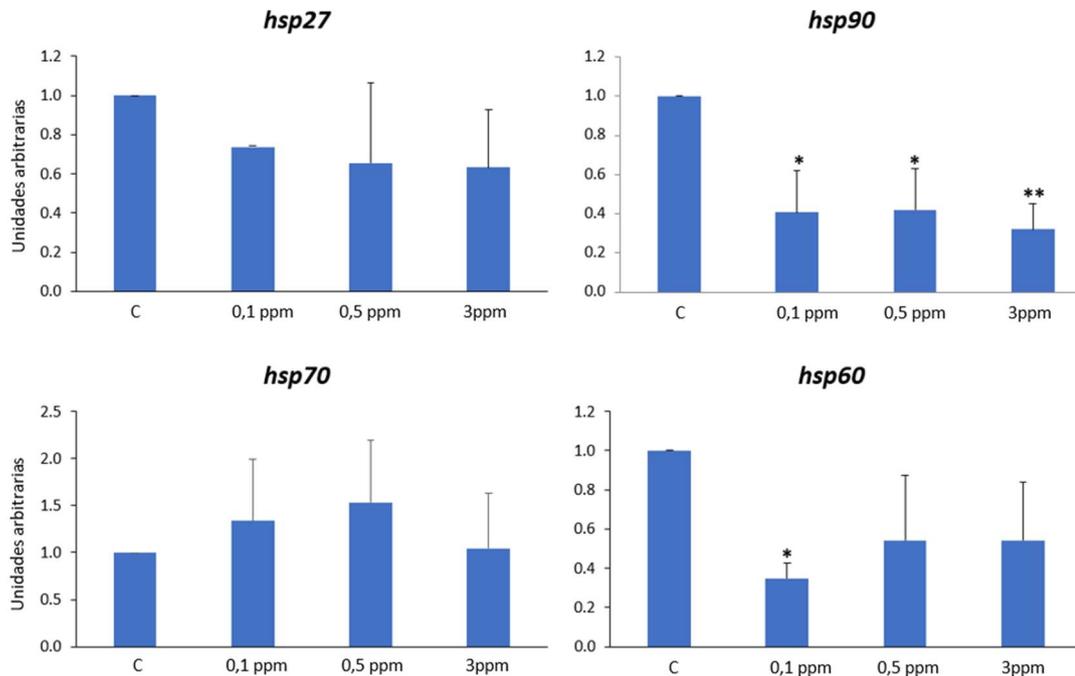


Figura 4: Gráfica en la que se muestra la expresión normalizada de los diferentes genes de las HSPs (*hsp27*, *hsp90*, *hsp70* y *hsp60*) en larvas de *C. riparius*, tras su exposición a diferentes concentraciones (control (C); 0,1 ppm; 0,5 ppm y 3 ppm) de NPs de PS tras 24h. Se marcan con un * los genes que presentaron una diferencia de expresión significativa con $p < 0,05$ y con ** si $p < 0,01$. Los resultados fueron analizados con el programa SPSS, empleando ANOVA.

Los resultados obtenidos en el análisis de expresión génica (Figura 4) muestran, por un lado, un descenso de la expresión en los genes de *hsp27*, *hsp60* y *hsp90* donde se puede apreciar que este descenso es dosis dependiente respecto al grupo control, especialmente en *hsp90* donde el descenso es estadísticamente significativo. Mientras que, por otro lado, la expresión de *hsp70* aumenta a las diferentes concentraciones estudiadas, aunque lo hace de manera independiente de la dosis de NPs de PS suministrada.

El descenso en la expresión de las HSPs puede sugerir una respuesta deficiente al estrés. Sin embargo, como se indicó anteriormente, las HSPs están implicadas en los procesos de regulación de la apoptosis (Figura 3), por lo que este descenso de la expresión podría estar relacionada con los mecanismos de activación de la apoptosis, justificando la regulación a la baja de la expresión obtenida de *hsp27* y *hsp90*. Resultados similares fueron obtenidos en larvas de *C. riparius* expuestas a nanotubos de carbono (Martínez-Paz et al., 2019).

Por otro lado, el aumento de la expresión a las concentraciones de 0,1 y 0,5 ppm del gen *hsp70*, demuestra su activación en respuesta a estrés oxidativo y/o en la regulación de la apoptosis. Otros estudios también han reportado la inducción de *hsp70* en *D. melanogaster* en presencia de contaminantes ambientales, metales pesados y nanopartículas de plata (Ahamed et al., 2010; Siddique et al., 2008, 2009), la inducción en la expresión de *hsp70* y la inhibición significativa de *hsp27* en presencia de sulfatiazol (Park & Kwak, 2018). La sobre expresión de *hsp70* en *C. riparius*, sugiere que esta proteína podría ser un biomarcador útil para la evaluación del daño producido por los nanomateriales.

2.2. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo consiste en la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que conducen al daño celular relacionado con los mecanismos de defensa y el desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes. La enzima superóxido dismutasa (SOD) está implicada en el mantenimiento de la homeostasis celular protegiendo a la célula del estrés oxidativo producido por ROS, por lo que se caracteriza por ser un potencial biomarcador de ecotoxicidad (Birben et al., 2012). SOD es una metaloenzima que cataliza la dismutación de superóxido en peróxido de hidrógeno y agua. La enzima manganeso superóxido dismutasa (SODMn) se caracteriza por estar presente en mitocondrias (Ahmad & Pardini, 1990).

Los resultados de este trabajo (Figura 5) muestran un descenso significativo de la expresión del gen *SODMn* tras 24h de exposición a las concentraciones de 0,5 y 3 ppm de NPs de PS con respecto al control. Aunque el resultado obtenido a 0,1 ppm no es estadísticamente significativo, presenta también un descenso de su expresión. Este descenso en la expresión de *SODMn* sugiere un agotamiento gradual de esta enzima y como consecuencia indica la incapacidad de SODMn para extinguir el exceso de radicales superóxidos. Se obtuvieron resultados similares tras exponer larvas de *C. riparius* durante 48h en presencia del antibiótico sulfadiazina (SDZ) (Xie et al., 2019). Además, estudios previos en embriones de pez cebra tratados con nanopartículas de plata (AgNPs) mostraron también un descenso en la expresión de *SODMn* (Lu et al., 2022). Sin embargo, otros estudios muestran un incremento de la expresión de *SODMn* tras la exposición de embriones de pez cebra a NPs de PS (Martin-Folgar, Torres-Ruiz, et al., 2023). El exceso de ROS inducidos por los NPs de PS puede conducir a la toxicidad celular (Q. Liu et al., 2020), mientras que la disminución de la expresión de la enzima SODMn podría reflejar

esta toxicidad y la inhibición de la respuesta antioxidante por agotamiento (Mu et al., 2016). No obstante, aún se necesitan más estudios para conocer la respuesta antioxidante frente a NPs de PS en organismos acuáticos y las causas de estas diferencias.

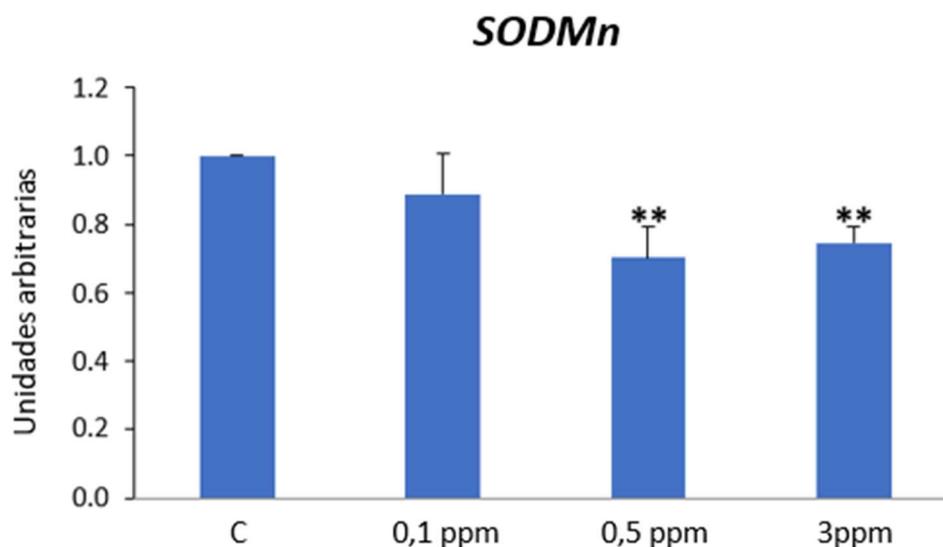


Figura 5. Gráfica en la que se muestra la expresión normalizada del gen *SODMn* en larvas de *C. riparius*, tras su exposición a diferentes concentraciones (control (C); 0,1 ppm; 0,5 ppm y 3 ppm) de NPs de PS tras 24h. Se representan con ** los genes que presentaron una diferencia significativa respecto al control con un $p < 0,01$. Los resultados fueron analizados con el programa SPSS, empleando ANOVA.

2.3. Reparación del ADN

La genotoxicidad produce daño en el ADN y está causada principalmente por radiación UV y por compuestos químicos. Este daño en el material genético puede llegar a ser reparado a través de proteínas implicadas en los mecanismos de reparación del ADN, que son capaces de llevar a cabo diferentes mecanismos de reparación como, la reparación por escisión de bases (BER), reparación por escisión de nucleótidos y la reparación de roturas de doble cadena (Figura 6) (Liu et al., 2018). Es por este motivo, que la genotoxicidad es considerada como uno de los parámetros de toxicidad más importantes a la hora de evaluar los riesgos ambientales (Aquilino et al., 2018b).

El ensayo cometa permite detectar de manera tanto cuantitativa como cualitativa bajos niveles de daño en el ADN en cualquier tipo de célula eucariota. Por tanto, mide el daño directo e indirecto producido en el ADN, lo que nos proporciona información acerca de la cantidad de células dañadas y de la gravedad. Sin embargo, también es necesario conocer los efectos de la expresión génica de los genes implicados en la reparación del

ADN (*xrcc1*, *ATM*, *NLK* Y *DECAY*) con el objetivo de conocer su actividad transcripcional (De Lapuente et al., 2015).

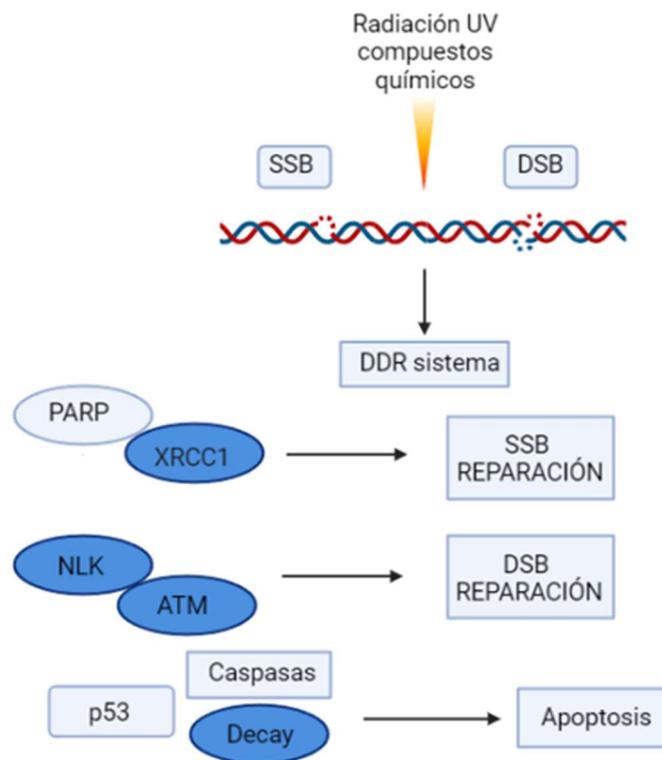


Figura 6. Ruta de respuesta al daño producido en el ADN. Imagen propia generada en Biorender.

En la Figura 6, se muestra que los daños físicos y químicos pueden afectar y fragmentar el ADN. En este caso los mecanismos de reparación se activarían para reparar dicho ADN, ya que las roturas del ADN de doble cadena (DSB), generan inestabilidad genómica. De manera que el sistema de detección y reparación de daño (DDR) conduce a la activación de la proteína ataxia-telangiectasia mutada (ATM), que está implicada en la transducción y amplificación de la señal del daño. Esta proteína, participa en la fosforilación de proteínas involucradas en la reparación del daño de ADN de doble cadena, y contribuye a llevar a cabo la activación del punto de control del ciclo celular (Martín et al., 2009). Además, el gen *xrcc1*, codifica para una enzima que participa en los mecanismos de reparación por escisión de bases (BER), por lo que está implicada en los procesos de reparación de roturas de ADN de cadena sencilla (SSB) (Brem, 2005). Por otro lado, la proteína NLK, que pertenece a la familia de *NEMO-like kinases*, está implicada en la transducción de señales. Estudios recientes han demostrado su actividad en los mecanismos de reparación del ADN. Esta proteína, participa en la activación de p53 como respuesta al daño genotóxico (Wang et al., 2014b). De manera que la no

activación de NLK conlleva a la inactivación de p53, evitando la activación de la apoptosis celular en este punto.

Finalmente, DECAF es una caspasa efectora de clase II, cuya expresión en células *in vitro* induce la apoptosis. Esta proteína comparte homología con las caspasas 3 y 7 en mamíferos. En *Drosophila*, está involucrada en procesos de muerte celular programada durante el desarrollo (Dorstyn et al., 1999).

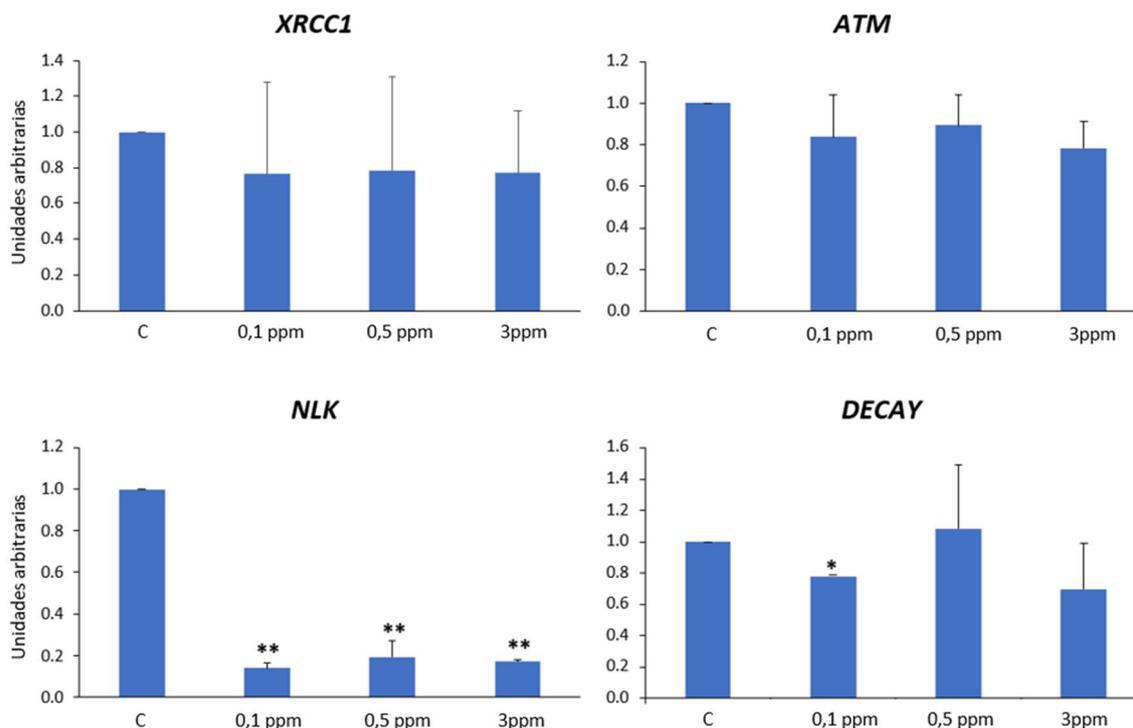


Figura 7. Gráfica en la que se muestra la expresión normalizada de los genes *Xrcc1*, *ATM*, *NLK* y *DECAF*, en larvas del cuarto estadio de *C. riparius*, tras su exposición a diferentes concentraciones (control (C); 0,1 ppm; 0,5 ppm y 3 ppm) de NPs de PS tras 24h. Se representan con * los genes que presentaron una diferencia significativa respecto al control con un $p < 0,05$ y con ** aquellos con $p < 0,01$. Los resultados fueron analizados con el programa SPSS, empleando ANOVA.

Los resultados obtenidos tras 24h de exposición de larvas de *C. riparius* a las diferentes concentraciones de NPs de PS (Figura 7), muestran un descenso en la expresión de los genes *ATM*, *NLK*, *DECAF* y *xrcc1*, Siendo estadísticamente significativo este descenso en el gen *NLK*. La disminución de la expresión no aparenta ser dosis dependiente en ninguno de los casos. Estos resultados sugieren que los NPs de PS inhiben la expresión de *ATM*, al igual que otros compuestos como la cafeína, esta inhibición está asociada con inestabilidad genómica, inmunodeficiencia y susceptibilidad al cáncer, entre otros (Weber & Ryan, 2015). Otros estudios también han demostrado inhibición de *xrcc1*

en presencia otros compuestos xenobióticos como el cadmio (Cd) o el plomo (Pb), e impidiendo así su función en los mecanismos de reparación BER (Antoniali et al., 2015; X. Liu et al., 2018). En estudios previos obtuvieron resultados similares tras la expresión de *C. riparius* a nanotubos de carbono (Martínez-Paz et al., 2019). La inhibición de *NLK* y *DECAY* sugiere que no se está llevando a cabo la activación de la apoptosis, ni procesos de muerte celular programada.

2.4. Sistema endocrino

Los disruptores endocrinos (EDC), son sustancias capaces de alterar procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares en un organismo al interferir con las redes de regulación hormonales endógenas. Las afecciones de esta disrupción pueden alterar a diferentes procesos como el desarrollo, el crecimiento, la reproducción, inmunológicos y neurológicos (Cuvillier-Hot & Lenoir, 2020).

La hormona de la ecdisona, también llamada 20-hidroxiecdiecdisona (20-E), es un esteroide cuya función es regular la proliferación, diferenciación y apoptosis celular a lo largo del ciclo vital de los insectos (Riddiford et al., 2000). Además, los pulsos de la hormona ecdisona controlan la metamorfosis, regulando la transformación de larva a pupa (Figuras 2 y 8) (Schwedes & Carney, 2012). La ecdisona desencadena una cascada de transcripción génica al unirse al receptor de hormonas nucleares. Este receptor, es un heterodímero constituido por el receptor nuclear de la ecdisona (EcR) y la proteína ultraespícula (USP) (Yao et al., 1992). La unión de 20-E a su receptor nuclear EcR/USP (Figura 8), actúa como un factor de transcripción dependiente de ligando que activa un conjunto de genes tempranos, entre los que se encuentran *E74*, *E75*, *Broad* y *E93* (Figura 8) (Bernardo et al., 2014). En presencia de la ecdisona, los genes de respuesta temprana median la activación de los genes de respuesta tardía, que a su vez regularán la expresión de los genes efectores a través de la unión específica al ADN.

La expresión del gen *EcR* es inducida en presencia de ecdisona, este gen es específico para cada tejido y etapa, ya que desempeña un papel dual, actuando como activador o represor de los genes tempranos (Li et al., 2016). Por un lado, *E74* es uno de los primeros genes inducidos por edisteroides, y actúa como un factor de transcripción clave durante la metamorfosis (Planelló et al., 2015). Por otro lado, *E93* controla tanto en insectos hemimetábolos como holometábolos el paso a la diferenciación adulta, ya que la ausencia de esta proteína está relacionada con la continuidad de la juventud (Ureña et al., 2014). Ya que, es un factor de transcripción que favorece la expresión de genes de la

etapa adulta, y codifica para un regulador de esteroides que induce la respuesta primaria a la ecdisona (Uyehara et al., 2017).

Los picos de expresión de la ecdisona regulan la muda, la proliferación, diferenciación y muerte celular, de manera estrictamente controlada y sincronizada. Durante la transición de larva a pupa, los tejidos larvarios obsoletos se eliminan y reemplazan por tejidos adultos. E-20 controla la regulación positiva de genes apoptóticos de entre los cuales se encuentra *DRONC*, la cual es una caspasa similar a (Nedd-2). Además, E-20 regula negativamente la expresión de genes inhibidores de la apoptosis (Kilpatrick et al., 2005).

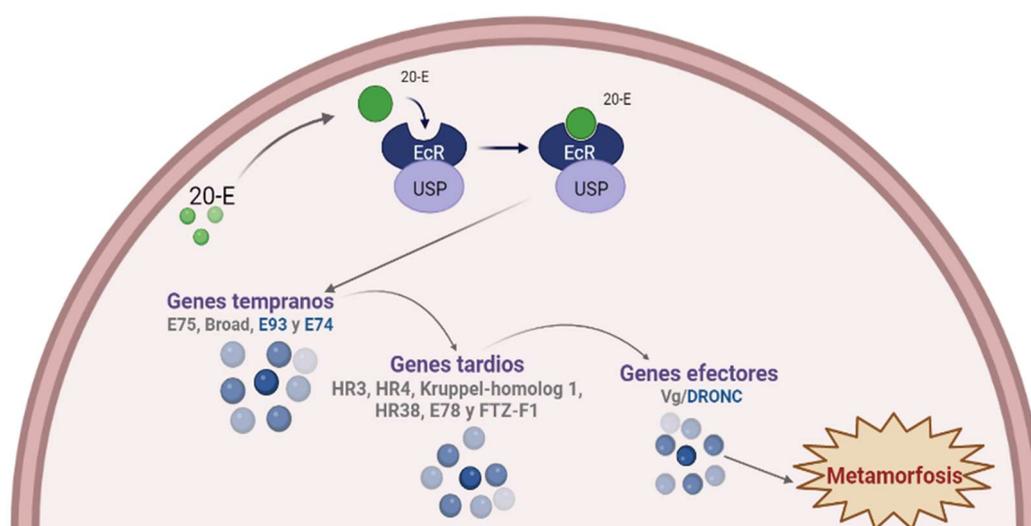


Figura 8. Ruta de la ecdisona (20-E), la unión de 20-E a su receptor nuclear EcR/USP desencadena una cascada transcripcional que conduce a una serie de cambios. Imagen propia generada en Biorender.

Los resultados obtenidos en este trabajo (Figura 9) muestran, un descenso significativo en la expresión de los genes *EcR*, *E93* y *E74* respecto a la muestra control, tras 24h de exposición a los NPs de PS. Mientras que la expresión del gen *DRONC* no cambia a 0,1ppm, por el contrario a 0,5 ppm y 3 ppm la expresión comienza a descender. Estos resultados indican una alteración en la ruta de la ecdisona, lo que conlleva a una inhibición de los genes de respuesta temprana y como consecuencia a una desregulación en la expresión de los genes efectores (*DRONC*). El descenso en la expresión obtenido del gen *EcR*, sugiere un descenso en los niveles de 20-E. Este resultado también se obtuvo en larvas de *C. riparius* expuestas a microplásticos (MPs) de PS durante 48h y en presencia de nonifenol (NP) durante 24h (de la Fuente et al., 2022; Muñoz-González, Silva, et al., 2021). *EcR* también disminuyó su expresión tras la exposición de *C. riparius*

al plastificante ftalato de butilbencilo (BBP) y bisfenol S (BPS) (Herrero et al., 2015, 2018). Por lo que estos resultados sugieren que un descenso en la expresión de *EcR*, *E74*, *E94* y *DRONC* inducido por los NPs de PS, podrían estar impidiendo la activación de la cascada de respuesta a la ecdisona y por tanto retrasando la metamorfosis.

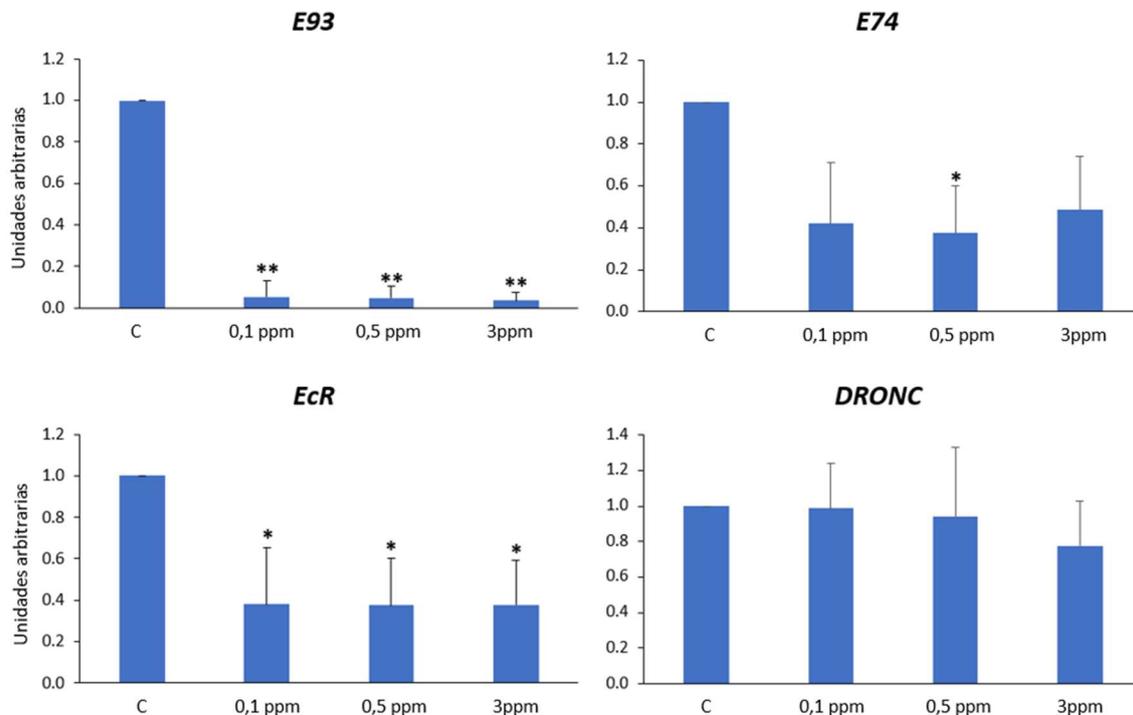


Figura 9. Gráfica en la que se muestra la expresión normalizada de los genes *EcR*, *E93*, *E74*, Y *DRONC*, en larvas de *C. riparius*, tras su exposición a diferentes concentraciones (control (C); 0,1 ppm; 0,5 ppm y 3 ppm) de NPs de PS tras 24h. Se representan con * los genes que presentaron una diferencia significativa respecto al control con un $p < 0,05$ y con ** aquellos con $p < 0,01$. Los resultados fueron analizados con el programa SPSS, empleando ANOVA.

2.5. Desarrollo

El desarrollo y el crecimiento en insectos está regulado por dos hormonas lipofílicas, 20-hidroxiecdisona (20-E) (Figura 8) y la hormona juvenil (JH). El mecanismo de acción de la JH aún sigue siendo desconocido. Sin embargo, se sabe que durante el desarrollo de las larvas la JH modula la acción de la 20-E retrasando la metamorfosis. Estudios recientes han descubierto que dos proteínas Chd64 y FKBP39 desempeñan un papel fundamental en la interacción entre JH y 20-E, aunque aún se desconoce la base molecular de esta interacción. Se ha demostrado que estas dos proteínas se unen al elemento de respuesta de JH (JHRE) y al receptor nuclear *EcR/USP*, lo que

sugiere que estas dos proteínas son necesarias para la acción de la JH y por tanto están implicadas en el desarrollo (Y. Li et al., 2007).

Además, las proteínas FKBP, son un grupo de proteínas muy conservadas que participan en la regulación transcripcional y la modificación de las histonas. FKBP39, juega un papel esencial en la inhibición de la autofagia mediante la regulación de la vía del factor de transcripción FOXO (vía del receptor de la insulina) (Juhász et al., 2007), de manera, que para que la metamorfosis tenga lugar se tiene que producir la inducción de la autofagia. Es decir, los niveles de FKBP39 durante el paso de larva a pupa, han de ser bajos (Carrasco-Navarro et al., 2021). Además, presenta un dominio similar a la nucleoplasmina (NPL) lo que le otorga la función de regulación de la cromatina (Ghartey-Kwansah et al., 2018).

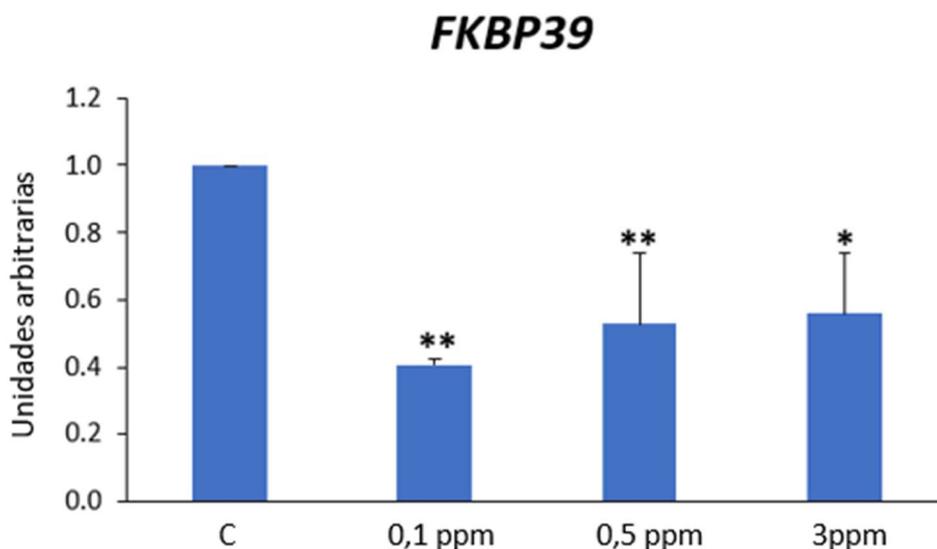


Figura 10. Gráfica en la que se muestra la expresión normalizada del gen *FKBP39*, en larvas de *C. riparius*, tras su exposición a diferentes concentraciones (control (C), 0,1 ppm; 0,5 ppm y 3 ppm) de NPs de PS tras 24h. Se representa con * las concentraciones que presentaron una diferencia significativa respecto al control con un $p < 0,05$ y con ** aquellas con $p < 0,01$. Los resultados fueron analizados con el programa SPSS, empleando ANOVA.

Los resultados obtenidos (figura 10), muestran un descenso significativo de la expresión del gen *FKBP39*, respecto a la muestra control, tras 24h de exposición a los NPs de PS. La regulación a la baja del gen *FKBP39* también se obtuvo en larvas de *C. riparius* expuestas a óxidos de grafeno con diferentes tamaños y dimensiones (Martin-Folgar, Esteban-Arranz, et al., 2023). En este sentido, los NPs de PS parecen afectar la expresión de este gen, pero aún se desconoce el efecto que esto puede tener a nivel de la

metamorfosis, aunque, es posible que la metamorfosis no se vea afectada debido a la inhibición de la expresión de este gen.

2.6. Proteína transportadora de oxígeno

Desde un punto de vista evolutivo, generalmente se admite que la presencia de hemoglobinas (Hbs) en invertebrados revela la adaptación de estos organismos a condiciones ambientales desfavorables, ya que la Hb les permite mantener un metabolismo aeróbico en condiciones de hipoxia. A pesar de esta peculiaridad, hay pocos estudios toxicológicos que se hayan centrado en las hemoglobinas de los quironómidos como indicador de toxicidad (Choi & Roche, 2004). La Hb de quironómidos presenta características interesantes, como una alta afinidad por el oxígeno, una localización extracelular y un alto grado de polimorfismo (Osmulski & Leyko, 1986). La Hb de manera fisiológica participa en el transporte y el almacenamiento del oxígeno. Además, se ha propuesto la actividad de la Hb en el metabolismo de compuestos xenobióticos en ambientes altamente contaminados, permitiendo la supervivencia de los quironómidos. (Choi & Ha, 2009).

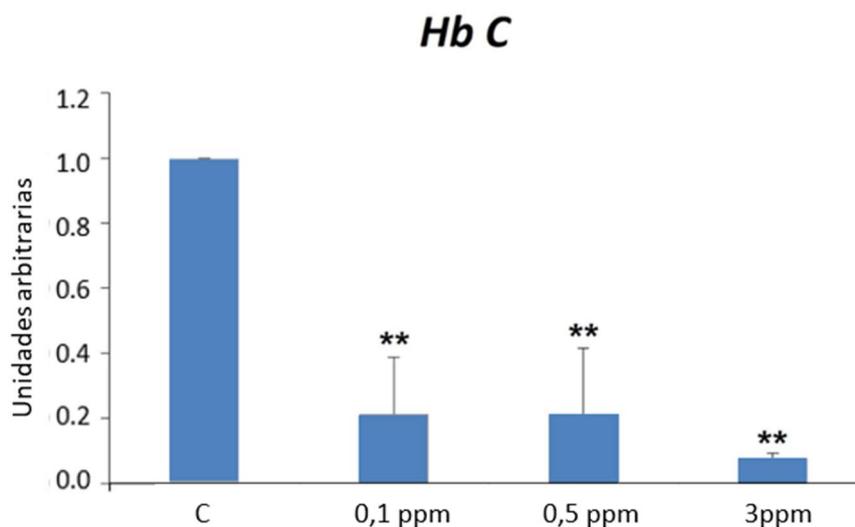


Figura 11. Gráfica en la que se muestra la expresión normalizada del gen *HbC*, en larvas de *C. riparius*, tras su exposición a diferentes concentraciones (control (C); 0,1 ppm; 0,5 ppm y 3 ppm) de NPs de PS tras 24h. Se representa con ** las concentraciones que presentaron una diferencia significativa respecto al control con un $p < 0,01$. Los resultados fueron analizados con el programa SPSS, empleando ANOVA.

Los resultados obtenidos en el presente estudio (Figura 11), muestran un descenso altamente significativo de la expresión del gen *HbC* con respecto a la muestra control, tras 24h de exposición a los NPs de PS. Este descenso de la expresión aparenta ser dosis dependiente, ya que, aunque la expresión permanezca constante a las concentraciones de 0,1 ppm y 0,5 ppm, el descenso producido a la concentración de 3 ppm es altamente superior. Estos resultados concuerdan con la inhibición de la eritrogenesis tras la

exposición a nanopartículas de plata (AgNPs) en embriones de pez cebra (Cui et al., 2016), y con el descenso significativo en los niveles de hemoglobina en *Myoxocephalus scorpius* expuesto naturalmente a un alto contenido de bifenilos policlorados (PCB) (Khan, 2011). Sin embargo, la expresión génica de la hemoglobina en *Daphnia magna* y *C. riparius* tras la exposición a contaminantes ambientales no se vio modificada (Ha & Choi, 2008, 2009). En el presente estudio se ha demostrado que los NPs son capaces de alterar el perfil de expresión de la *HbC*, hasta casi inhibir su expresión. Sin embargo, hay que profundizar más en el efecto que tienen los NPs sobre las Hbs. Estos resultados postulan a la *HbC* como una buena candidata como biomarcador de efecto de los NPs.

2.7. Sistema inmune

Para la evaluación de los efectos de los NPs de PS sobre el sistema inmune en *C. riparius*, se eligió el sistema profenoloxidasa (proPO), implicado en la cascada de la melanización, para la defensa celular mediante los procesos de fagocitosis y encapsulación (Figura 12). Este tipo de respuesta pertenece a la respuesta de la inmunidad innata en artrópodos e invertebrados (Shi et al., 2014).

La activación de *proPO* es un proceso estrictamente controlado (Figura 12), donde ciertos productos microbianos, como los peptidoglicanos o los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias y hongos, también conocidos como PAMPS (patrones moleculares asociados a patógenos), desencadenan la activación del sistema proPO al entrar en contacto con las proteínas de reconocimiento específicas. No obstante, esta activación también puede ocurrir en caso de lesiones en la cutícula y la presencia de células con apoptosis alterada (Cerenius et al., 2008). La activación del sistema proPO da lugar a una cascada de serina proteasas que están implicadas en la activación del precursor de la enzima activadora de la profenoloxidasa (proPAP), de manera que pasa de su forma inactiva a su forma activa (PAP). PAP lleva a cabo la escisión proteolítica de la profenoloxidasa a fonoloxidasa (PO). PO participa en la oxigenación de compuestos fenólicos como la tirosina, para dar lugar a quininas. Donde la enzima fenoloxidasa-monofenil-L-dopa emplea quinina para la polimerización de melanina, la cual es utilizada en los procesos de melanización, implicados en la respuesta frente a patógenos (Sheehan et al., 2018).

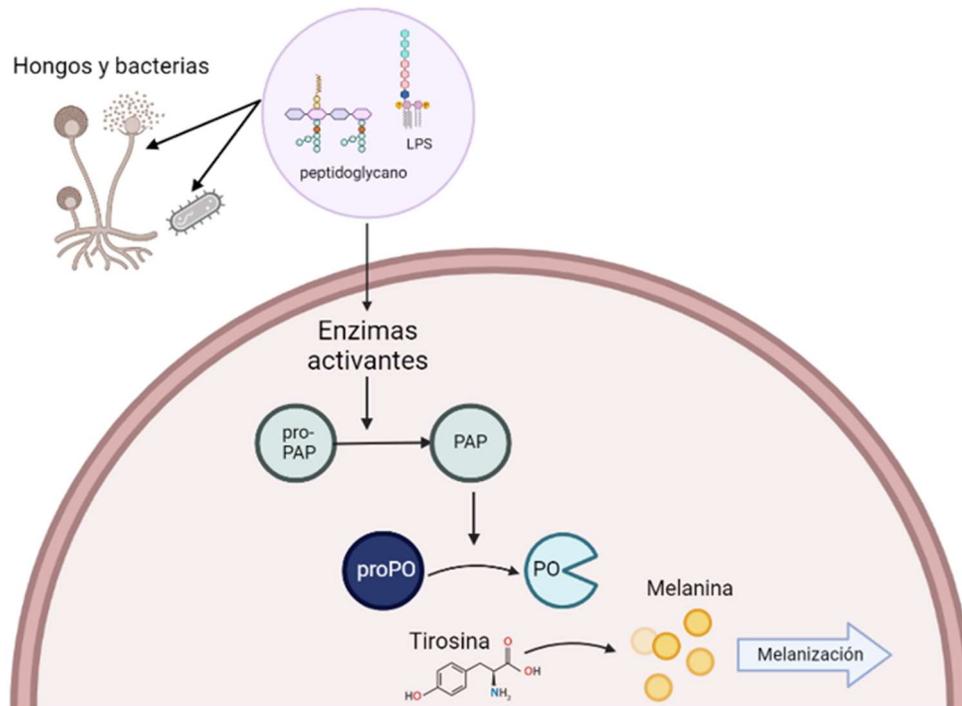


Figura 12. Sistema profenoloxidasa (proPO). La activación del sistema proPO causado por PAMPs, desencadena los procesos de melanización implicados en la inmunidad innata de *C. riparius*. Imagen propia generada en biorender.

Los resultados obtenidos tras 24h de exposición a los NPs de PS (Figura 13), muestran un incremento estadísticamente significativo de la expresión del gen *proPO*, en comparación con la obtenida en la muestra control. Este incremento de la expresión es aparentemente dosis dependiente, ya que a mayor concentración de NPs de PS, mayor expresión del gen *proPO*. Este resultado está respaldado por otros estudios realizados sobre camarones de *Macrobrachium nipponense* y camarones patiblancos *Litopenaeus vannamei*, tras su exposición a MPs (Li et al., 2020; Wang et al., 2021). En *C. riparius* también se produjo un aumento de la expresión del gen *proPO* en presencia de ibuprofeno y del filtro ultravioleta benzofenona-3 (BP3) (Muñiz-González, 2021; Muñiz-González & Martínez-Guitarte, 2020). Nuestros resultados parecen demostrar que los NPs también son capaces de activar la respuesta inmune de *C. riparius* siendo reconocidos por el propio organismo como un patógeno. Este gen se postula como un buen biomarcador de expresión para evaluar los efectos de los micro- y nanomateriales de plástico.

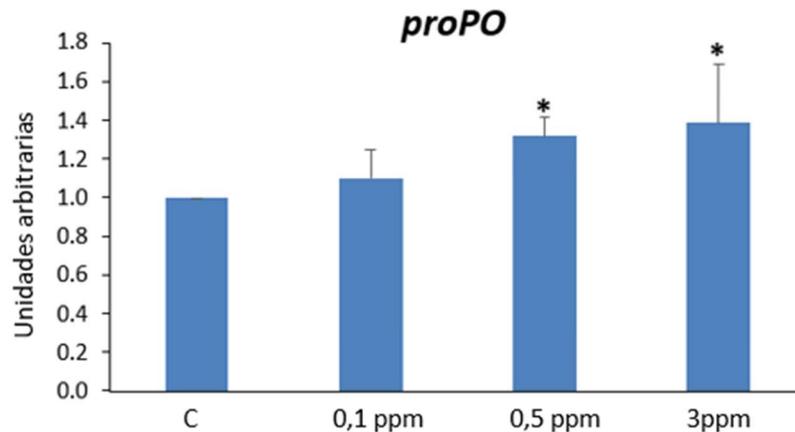


Figura 13. Gráfica en la que se muestra la expresión normalizada del gen *proPO*, en larvas de *C. riparius*, tras su exposición a diferentes concentraciones (control (C); 0,1 ppm; 0,5 ppm y 3 ppm) de NPs de PS tras 24h. Se representa con * las concentraciones que presentaron una diferencia significativa respecto al control con un $p < 0,05$. Los resultados fueron analizados con el programa SPSS, empleando ANOVA.

3. Ensayo cometa

Para la evaluación del daño genotóxico producido por los NPs de PS en larvas del cuarto estadio de *C. riparius*, se realizó el ensayo cometa (electroforesis en gel de una sola célula) en condiciones alcalinas, ya que permite la detección de roturas en el ADN de cadena simple y de doble cadena, actividad de reparación incompleta y sitios álclicos lábiles (Singh et al., 1988). Para la cuantificación del daño se seleccionaron dos parámetros obtenidos tras el ensayo cometa: el porcentaje de ADN en la cola y el momento oliva. Donde, por un lado, el porcentaje de ADN en la cola ofrece información acerca del daño total producido en el ADN por el compuesto genotóxico. Mientras que, el momento oliva relaciona el daño total con la media del tamaño de los fragmentos (Martínez de Paz, 2014).

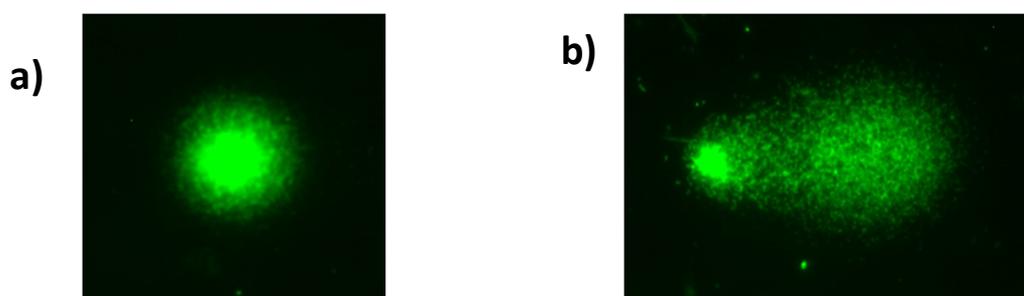


Figura 14. Imágenes de microscopía de fluorescencia donde se muestran células de *C. riparius* tras el ensayo cometa. La imagen a) muestra una célula control, no tratada con NPs de PS. La imagen b) muestra una célula con daño genotóxico tras la exposición con NPs de PS a una concentración de 3ppm durante 24h.

En este estudio nos propusimos ver los efectos de los NPs de PS en larvas de *C. riparius* a diferentes concentraciones (0,1ppm, 0,5ppm y 3ppm) durante 24h. Los resultados obtenidos en este estudio (Figura 15), muestran diferencias estadísticamente significativas con respecto a la muestra control, tanto en el porcentaje de ADN en cola, como en el momento oliva. El análisis demuestra que los NPs de PS son capaces de producir daño en el ADN de *C. riparius*. Por este motivo, las roturas en el ADN pueden servir como indicador de genotoxicidad causado por NPs de PS. Estos resultados concuerdan con los estudios de genotoxicidad con NPs llevados a cabo en el mejillón marino (*Mytilus galloprovincialis*) (Gonçalves et al., 2022), en *Drosophila melanogaster* (Turna Demir et al., 2022), en líneas celulares humanas como Caco-2 y HepG2 (Roursgaard et al., 2022). Y en peces como *Ctenopharyngodon idella* juveniles expuestos a NPs de PS (Guimarães et al., 2021).

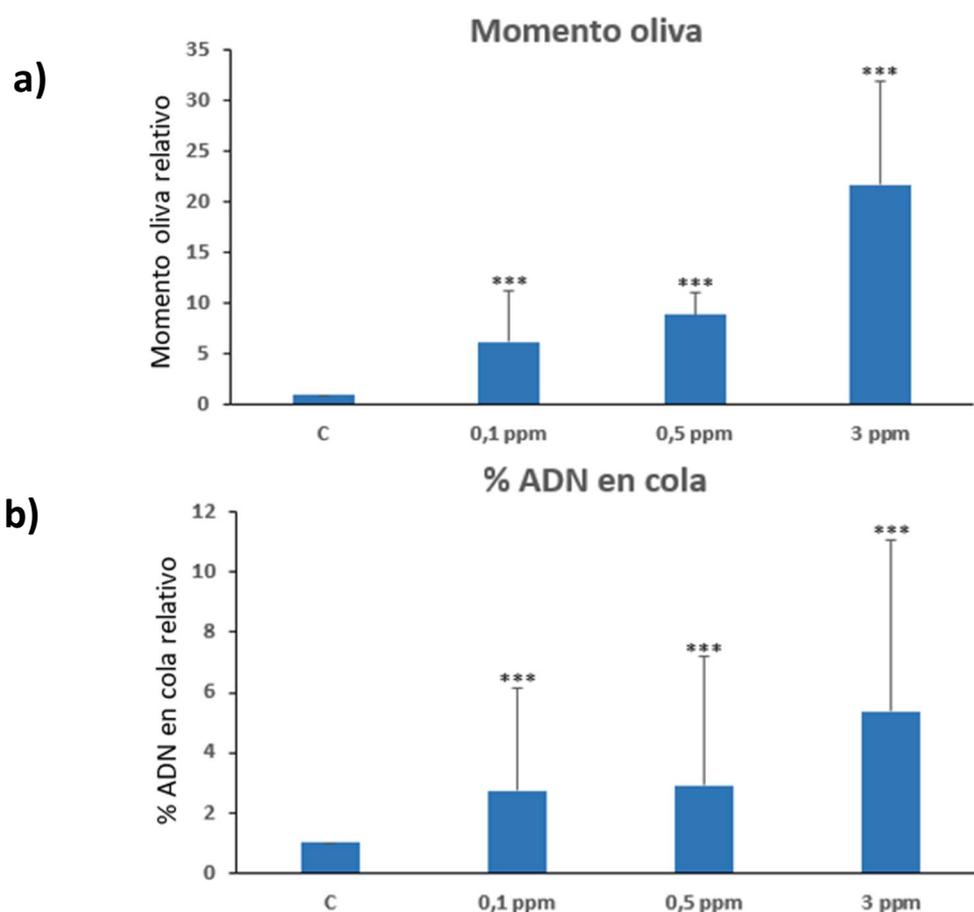


Figura 15. Gráfica en la que se muestra la expresión normalizada del momento oliva (imagen a) y del porcentaje de ADN en cola (imagen b), en larvas de *C. riparius*, tras su exposición a diferentes concentraciones (control (C); 0,1 ppm; 0,5 ppm y 3 ppm) de NPs de PS tras 24h. Se representa con *** las concentraciones que presentaron una diferencia significativa respecto al control con un $p < 0,001$. Los resultados fueron analizados con el programa SPSS, empleando ANOVA.

Conclusiones

En el presente trabajo, se llevó a cabo un estudio de supervivencia en un modelo de referencia como bioindicador de calidad de agua, *C. riparius*, donde la exposición a diferentes concentraciones de NPs de PS durante 96h no afectó a la supervivencia de estas larvas. Por otro lado, se analizaron los efectos que los NPs de PS a bajas concentraciones y a un tiempo corto de exposición, tienen sobre los genes seleccionados en este estudio y que están implicados en diferentes rutas en *C. riparius*. Concretamente se analizaron las rutas de estrés celular, estrés oxidativo, respuesta al daño en el ADN, sistema endocrino, respuesta en el desarrollo, transporte de oxígeno y sistema inmune. Los resultados mostraron cambios significativos en la expresión de prácticamente todos los genes estudiados.

En primer lugar, la ruta de estrés celular, presentó una activación de la expresión del gen *hsp70*, lo que sugiere un exceso de estrés oxidativo causado por los NPs de PS. La HSP70 podría estar actuando impidiendo que se desencadenen procesos apoptóticos. Mientras que, por otro lado, la inhibición de los genes *hsp27*, *hsp60* y *hsp90* indican una respuesta ineficiente al estrés, lo que podría generar problemas en el plegamiento de proteínas y en la apoptosis celular.

En segundo lugar, la inhibición transcripcional del gen *SODMn*, podría estar ocasionada por un exceso de ROS, que no permite a la célula llevar a cabo una respuesta antioxidante debido al agotamiento. El exceso de ROS puede conducir al daño oxidativo en el ADN. Esto parece ser corroborado tanto a través del ensayo cometa, donde se observa daño en el ADN a todas las concentraciones de NPs de PS estudiadas; como por la inhibición de la expresión de los genes implicados en la reparación del ADN (*ATM*, *NLK*, *xrcc1* y *DECAY*). Es posible que los mecanismos de reparación no tengan la capacidad para responder a este daño. Estos resultados sugieren que la sobreacumulación de ROS generada por la exposición a NP de PS, parece desencadenar daño genotóxico.

En tercer lugar, el descenso de la expresión de genes endocrinos (*EcR*, *E74*, *E93* y *DRONC*), sugiere una inhibición de la cascada de respuesta a la ecdisona, pudiendo provocar un retraso de la metamorfosis. Además de verse alterado también el perfil de expresión de *FKBP39*, pudiendo afectar al desarrollo de *C. riparius*.

En cuarto lugar, la inhibición de la expresión de *HbC* implicada en el transporte de oxígeno, sugiere que la supervivencia de *C. riparius* en ambientes contaminados por NPs de PS puede verse comprometida. Sin embargo, hacen falta más estudios para conocer el porqué de esta inhibición. No obstante, la respuesta de *HbC* en presencia de NPs de PS, la propone como un buen biomarcador de ecotoxicidad por NPs.

Finalmente, la activación del sistema inmunológico, sugerido por un incremento en la expresión del gen *proPO*, indica que los NPs de PS podrían ser reconocidos por las células como patógenos, desencadenando la cascada de melanización implicada en la inmunidad innata en invertebrados.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran tanto la inhibición de los genes apoptóticos (*DRONC*, *DECAY* y *NLK*), como de los genes implicados en los mecanismos de reparación en el ADN (*ATM* y *xrcc1*). Por lo que, es posible, que el exceso de ROS podría desencadenar daño genotóxico (ensayo cometa), que junto con la inhibición de los genes de reparación del ADN y los genes apoptóticos, podrían conducir a la célula a desarrollar procesos oncogénicos. Aunque se necesita profundizar más en este campo.

Este estudio, destaca la toxicidad y el riesgo de los NPs de PS, en los ecosistemas acuáticos y concretamente a los invertebrados. Además, este trabajo abre nuevas líneas de investigación, tanto para seguir evaluando los efectos de estos nanomateriales a nivel celular y molecular, como para evaluar cómo estos contaminantes podrían afectar a las siguientes generaciones.

Bibliografía:

- Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria (ACSA). (2019). *Microplásticos y nanoplásticos en la cadena alimentaria. Situación actual* (p. 33). Generalitat de Catalunya.
<http://acsa.gencat.cat/>
- Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T. J., Nielsen, M., Hussain, S. M., & Rowe, J. J. (2010). Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(3), 263-269.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.10.016>
- Ahmad, S., & Pardini, R. S. (1990). Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(4), 401-413.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90107-T](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90107-T)
- Antoniali, G., Marcuzzi, F., Casarano, E., & Tell, G. (2015). Cadmium treatment suppresses DNA polymerase δ catalytic subunit gene expression by acting on the p53 and Sp1 regulatory axis. *DNA Repair*, 35, 90-105. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.08.007>
- Aquilino, M., Sánchez-Argüello, P., & Martínez-Guitarte, J.-L. (2018a). Genotoxic effects of vinclozolin on the aquatic insect *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Environmental Pollution*, 232, 563-570. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.088>
- Aquilino, M., Sánchez-Argüello, P., & Martínez-Guitarte, J.-L. (2018b). Genotoxic effects of vinclozolin on the aquatic insect *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Environmental Pollution*, 232, 563-570. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.088>
- Armitage, P. D., Pinder, L. C., & Cranston, p. (1995). *The Chironomidae: Biology and Ecology of Non-biting Midges*. Springer. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1646\(199701\)13:1%3C91::AID-RRR432%3E3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1646(199701)13:1%3C91::AID-RRR432%3E3.0.CO;2-N)
- Arrigo, A. P. (1998). Small stress proteins: Chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death. *Biological Chemistry*, 379(1), 19-26.

- Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M., Alfred-Wegener-Institut, & Göteborgs universitet (Eds.). (2015). *Marine anthropogenic litter*. Springer.
- Bernardo, T. J., Dubrovskaya, V. A., Xie, X., & Dubrovsky, E. B. (2014). A view through a chromatin loop: Insights into the ecdysone activation of early genes in *Drosophila*. *Nucleic Acids Research*, 42(16), 10409-10424. <https://doi.org/10.1093/nar/gku754>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Brem, R. (2005). XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Research*, 33(8), 2512-2520. <https://doi.org/10.1093/nar/gki543>
- Carrasco-Navarro, V., Muñoz-González, A.-B., Sorvari, J., & Martínez-Guitarte, J.-L. (2021). Altered gene expression in *Chironomus riparius* (insecta) in response to tire rubber and polystyrene microplastics. *Environmental Pollution*, 285, 117462. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117462>
- Cerenius, L., Lee, B. L., & Söderhäll, K. (2008). The proPO-system: Pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29(6), 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>
- Choi, J., & Ha, M.-H. (2009). Effect of cadmium exposure on the globin protein expression in 4th instar larvae of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae): An ecotoxicoproteomics approach. *PROTEOMICS*, 9(1), 31-39. <https://doi.org/10.1002/pmic.200701197>
- Choi, J., & Roche, H. (2004). Effect of Potassium Dichromate and Fenitrothion on Hemoglobins of *Chironomus Riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) Larvae: Potential Biomarker of Environmental Monitoring. *Environmental Monitoring and Assessment*, 92(1-3), 229-239. <https://doi.org/10.1023/B:EMAS.0000014503.23761.77>

- Cui, B., Ren, L., Xu, Q.-H., Yin, L.-Y., Zhou, X.-Y., & Liu, J.-X. (2016). Silver_ nanoparticles inhibited erythropoiesis during zebrafish embryogenesis. *Aquatic Toxicology*, *177*, 295-305. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.06.005>
- Cuvillier-Hot, V., & Lenoir, A. (2020). Invertebrates facing environmental contamination by endocrine disruptors: Novel evidences and recent insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *504*, 110712. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110712>
- de la Fuente, M., Folgar, R. M., Martínez-Paz, P., Cortés, E., Martínez-Guitarte, J. L., & Morales, M. (2022). Effect of environmental stressors on the mRNA expression of ecdysone cascade genes in *Chironomus riparius*. *Environmental Science and Pollution Research International*, *29*(7), 10210-10221. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16339-3>
- De Lapuente, J., Lourenço, J., Mendo, S. A., Borrás, M., Martins, M. G., Costa, P. M., & Pacheco, M. (2015). The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: A mature tool that continues to expand its perspectives. *Frontiers in Genetics*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00180>
- Dorstyn, L., Read, S. H., Quinn, L. M., Richardson, H., & Kumar, S. (1999). DECAP, a Novel *Drosophila* Caspase Related to Mammalian Caspase-3 and Caspase-7. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(43), 30778-30783. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.43.30778>
- Gharbey-Kwansah, G., Li, Z., Feng, R., Wang, L., Zhou, X., Chen, F. Z., Xu, M. M., Jones, O., Mu, Y., Chen, S., Bryant, J., Isaacs, W. B., Ma, J., & Xu, X. (2018). Comparative analysis of FKBP family protein: Evaluation, structure, and function in mammals and *Drosophila melanogaster*. *BMC Developmental Biology*, *18*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12861-018-0167-3>
- Gonçalves, J. M., Sousa, V. S., Teixeira, M. R., & Bebianno, M. J. (2022). Chronic toxicity of polystyrene nanoparticles in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*, *287*, 132356. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132356>

- Guerrero-Rojas, R., & Guerrero-Fonseca, C. (2019). Molecular mechanisms of heat shock proteins (HSPs) involved in neoplasm development. *Salud Uninorte*, 34(2), 455-474.
<https://doi.org/10.14482/sun.34.2.616.98>
- Guimarães, A. T. B., Estrela, F. N., Pereira, P. S., De Andrade Vieira, J. E., De Lima Rodrigues, A. S., Silva, F. G., & Malafaia, G. (2021). Toxicity of polystyrene nanoplastics in *Ctenopharyngodon idella* juveniles: A genotoxic, mutagenic and cytotoxic perspective. *Science of The Total Environment*, 752, 141937.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141937>
- Gupta, S. C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R. K., & Chowdhuri, D. K. (2010). Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? *Life Sciences*, 86(11-12), 377-384.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.12.015>
- Ha, M.-H., & Choi, J. (2008). Effects of environmental contaminants on hemoglobin of larvae of aquatic midge, *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae): A potential biomarker for ecotoxicity monitoring. *Chemosphere*, 71(10), 1928-1936.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.01.018>
- Ha, M.-H., & Choi, J. (2009). Effects of Environmental Contaminants on Hemoglobin Gene Expression in *Daphnia magna*: A Potential Biomarker for Freshwater Quality Monitoring. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(2), 330-337.
<https://doi.org/10.1007/s00244-007-9079-0>
- Herrero, Ó., Aquilino, M., Sánchez-Argüello, P., & Planelló, R. (2018). The BPA-substitute bisphenol S alters the transcription of genes related to endocrine, stress response and biotransformation pathways in the aquatic midge *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *PLOS ONE*, 13(2), e0193387.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193387>
- Herrero, Ó., Planelló, R., & Morcillo, G. (2015). The plasticizer benzyl butyl phthalate (BBP) alters the ecdysone hormone pathway, the cellular response to stress, the energy

- metabolism, and several detoxication mechanisms in *Chironomus riparius* larvae. *Chemosphere*, *128*, 266-277. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.059>
- Hoffmann, A. A., Sørensen, J. G., & Loeschcke, V. (2003). Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: Bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology*, *28*(3), 175-216. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(02\)00057-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(02)00057-8)
- Hwang, J., Choi, D., Han, S., Jung, S. Y., Choi, J., & Hong, J. (2020). Potential toxicity of polystyrene microplastic particles. *Scientific Reports*, *10*(1), 7391. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64464-9>
- Juhász, G., Puskás, L. G., Komonyi, O., Érdi, B., Maróy, P., Neufeld, T. P., & Sass, M. (2007). Gene expression profiling identifies FKBP39 as an inhibitor of autophagy in larval *Drosophila* fat body. *Cell Death & Differentiation*, *14*(6), 1181-1190. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402123>
- Kaźmierczuk, A., & Kiliańska, Z. M. (2010). [Role of heat shock proteins in cell apoptosis]. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczonej (Online)*, *64*, 273-283.
- Khan, R. A. (2011). Chronic Exposure and Decontamination of a Marine Sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) to Polychlorinated Biphenyls Using Selected Body Indices, Blood Values, Histopathology, and Parasites as Bioindicators. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *60*(3), 479-485. <https://doi.org/10.1007/s00244-010-9547-9>
- Kilpatrick, Z. E., Cakouros, D., & Kumar, S. (2005). Ecdysone-mediated Up-regulation of the Effector Caspase DRICE Is Required for Hormone-dependent Apoptosis in *Drosophila* Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(12), 11981-11986. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413971200>
- Koelmans, A. A. (2019). Proxies for nanoplastic. *Nature Nanotechnology*, *14*(4), 307-308. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0416-z>

- Li, K., Tian, L., Guo, Z., Guo, S., Zhang, J., Gu, S.-H., Palli, S. R., Cao, Y., & Li, S. (2016). 20-Hydroxyecdysone (20E) Primary Response Gene E75 Isoforms Mediate Steroidogenesis Autoregulation and Regulate Developmental Timing in *Bombyx*. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(35), 18163-18175. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.737072>
- Li, Y., Liu, Z., Li, M., Jiang, Q., Wu, D., Huang, Y., Jiao, Y., Zhang, M., & Zhao, Y. (2020). Effects of nanoplastics on antioxidant and immune enzyme activities and related gene expression in juvenile *Macrobrachium nipponense*. *Journal of Hazardous Materials*, 398, 122990. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122990>
- Li, Y., Zhang, Z., Robinson, G. E., & Palli, S. R. (2007). Identification and Characterization of a Juvenile Hormone Response Element and Its Binding Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 282(52), 37605-37617. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704595200>
- Liu, Q., Chen, C., Li, M., Ke, J., Huang, Y., Bian, Y., Guo, S., Wu, Y., Han, Y., & Liu, M. (2020). Neurodevelopmental Toxicity of Polystyrene Nanoplastics in *Caenorhabditis elegans* and the Regulating Effect of Presenilin. *ACS Omega*, 5(51), 33170-33177. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04830>
- Liu, X., Wu, J., Shi, W., Shi, W., Liu, H., & Wu, X. (2018). Lead Induces Genotoxicity via Oxidative Stress and Promoter Methylation of DNA Repair Genes in Human Lymphoblastoid TK6 Cells. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 24, 4295-4304. <https://doi.org/10.12659/MSM.908425>
- Lu, C., Lv, Y., Kou, G., Liu, Y., Liu, Y., Chen, Y., Wu, X., Yang, F., Luo, J., & Yang, X. (2022). Silver nanoparticles induce developmental toxicity via oxidative stress and mitochondrial dysfunction in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 243, 113993. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113993>
- Madrigal-Matute, J., López-Franco, Ó., Blanco-Colio, L. M., Muñoz-García, B., Ramos-Mozo, P., Ostrom, M. V., Meilhac, O., Michel, J.-B., Egado, J., & Martín Ventura, J. L. (2009). Las proteínas de choque térmico (heat shock proteins) como potenciales dianas

- terapéuticas en aterosclerosis. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 21(4), 163-172. [https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(09\)72041-8](https://doi.org/10.1016/S0214-9168(09)72041-8)
- Martín, M., Terradas, M., Iliakis, G., Tusell, L., & Genescà, A. (2009). Breaks *invisible* to the DNA damage response machinery accumulate in ATM-deficient cells. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 48(9), 745-759. <https://doi.org/10.1002/gcc.20679>
- Martínez de Paz, P. J. (2014). *Evaluación de la actividad citotóxica y genotóxica del nonilfenol, triclosán y bisfenol A en Chironomus riparius* [UNED. Universidad Nacional de Educación a Distancia]. http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/tesisuned:Ciencias-Pjmartinez/MARTINEZ_DE_PAZ_Pedro_Jose_Tesis.pdf
- Martínez-Paz, P., Morales, M., Martín, R., Martínez-Guitarte, J. L., & Morcillo, G. (2014). Characterization of the small heat shock protein Hsp27 gene in *Chironomus riparius* (Diptera) and its expression profile in response to temperature changes and xenobiotic exposures. *Cell Stress and Chaperones*, 19(4), 529-540. <https://doi.org/10.1007/s12192-013-0479-y>
- Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J. L., & Morcillo, G. (2012). Characterization of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposures to xenobiotics (tributyltin, nonylphenol, bisphenol A) in *Chironomus riparius* aquatic larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155(2), 333-343. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.10.001>
- Martínez-Paz, P., Negri, V., Esteban-Arranz, A., Martínez-Guitarte, J. L., Ballesteros, P., & Morales, M. (2019). Effects at molecular level of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) in *Chironomus riparius* (DIPTERA) aquatic larvae. *Aquatic Toxicology*, 209, 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.01.017>
- Martin-Folgar, R., Esteban-Arranz, A., Negri, V., & Morales, M. (2023). Graphene Oxides (GOs) with Different Lateral Dimensions and Thicknesses Affect the Molecular Response in

- Chironomus riparius. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 13(6), 967.
<https://doi.org/10.3390/nano13060967>
- Martín-Folgar, R., & Martínez-Guitarte, J.-L. (2017). Cadmium alters the expression of small heat shock protein genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Chemosphere*, 169, 485-492. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.067>
- Martín-Folgar, R., & Martínez-Guitarte, J.-L. (2019). Effects of single and mixture exposure of cadmium and copper in apoptosis and immune related genes at transcriptional level on the midge *Chironomus riparius* Meigen (Diptera, Chironomidae). *Science of The Total Environment*, 677, 590-598. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.364>
- Martin-Folgar, R., Torres-Ruiz, M., de Alba, M., Cañas-Portilla, A. I., González, M. C., & Morales, M. (2023). Molecular effects of polystyrene nanoplastics toxicity in zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 312, 137077.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137077>
- Mattsson, K., Jovic, S., Doverbratt, I., & Hansson, L.-A. (2018). Nanoplastics in the Aquatic Environment. En *Microplastic Contamination in Aquatic Environments* (pp. 379-399). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813747-5.00013-8>
- MITECO. (2018). *El estado de los plásticos*. UNEP.
<https://www.miteco.gob.es/es/ceneam/recursos/pag-web/estado-plasticos-2018.aspx>
- Morales, M., de la Fuente, M., & Martín-Folgar, R. (2020). BPA and its analogues (BPS and BPF) modify the expression of genes involved in the endocrine pathway and apoptosis and a multi drug resistance gene of the aquatic midge *Chironomus riparius* (Diptera). *Environmental Pollution*, 265, 114806. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114806>
- Morales, M., Martínez-Paz, P., Ozáez, I., Martínez-Guitarte, J. L., & Morcillo, G. (2013). DNA damage and transcriptional changes induced by tributyltin (TBT) after short in vivo exposures of *Chironomus riparius* (Diptera) larvae. *Comparative Biochemistry and*

Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 158(2), 57-63.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.05.005>

Morales, M., Planelló, R., Martínez-Paz, P., Herrero, O., Cortés, E., Martínez-Guitarte, J. L., & Morcillo, G. (2011). Characterization of Hsp70 gene in *Chironomus riparius*: Expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 153(1), 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.10.003>

Mu, X., Chai, T., Wang, K., Zhu, L., Huang, Y., Shen, G., Li, Y., Li, X., & Wang, C. (2016). The developmental effect of difenoconazole on zebrafish embryos: A mechanism research.

Environmental Pollution, 212, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.035>

Muñiz-González, A.-B. (2021). Ibuprofen as an emerging pollutant on non-target aquatic invertebrates: Effects on *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and*

Pharmacology, 81, 103537. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103537>

Muñiz-González, A.-B., & Martínez-Guitarte, J.-L. (2020). Combined effects of benzophenone-3 and temperature on gene expression and enzymatic activity in the aquatic larvae *Chironomus riparius*. *Science of The Total Environment*, 698, 134292.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134292>

Muñiz-González, A.-B., Novo, M., & Martínez-Guitarte, J.-L. (2021). Persistent pesticides: Effects of endosulfan at the molecular level on the aquatic invertebrate *Chironomus riparius*. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(24), 31431-31446.

<https://doi.org/10.1007/s11356-021-12669-4>

Muñiz-González, A.-B., Silva, C. J. M., Patricio Silva, A. L., Campos, D., Pestana, J. L. T., &

Martínez-Guitarte, J.-L. (2021). Suborganismal responses of the aquatic midge *Chironomus riparius* to polyethylene microplastics. *Science of The Total Environment*, 783, 146981. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146981>

- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*, 311(5761), 622-627. <https://doi.org/10.1126/science.1114397>
- Nollen, E. A. A., & Morimoto, R. I. (2002). Chaperoning signaling pathways: Molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell Science*, 115(14), 2809-2816. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.14.2809>
- OCDE. (2004). *Guideline for testing of chemicals, sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment*. (N.º 218). Organization for Economic Co-operation and Development.
- OCDE. (2010). *Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment*.
- OCDE. (2011). *Test No. 235: Chironomus sp., Acute Immobilisation*.
- Osmulski, Paweł A., & Leyko, W. (1986). Structure, function and physiological role of chironomus haemoglobin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 85(4), 701-722. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(86\)90166-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(86)90166-5)
- Palacios Anzules, Í. del C., & Moreno Castro, D. W. (2022). Contaminación ambiental. *RECIMUNDO*, 6(2), 93-103. [https://doi.org/10.26820/recimundo/6.\(2\).abr.2022.93-103](https://doi.org/10.26820/recimundo/6.(2).abr.2022.93-103)
- Park, K., & Kwak, I.-S. (2008). Characterization of heat shock protein 40 and 90 in *Chironomus riparius* larvae: Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate exposure on gene expressions and mouthpart deformities. *Chemosphere*, 74(1), 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.041>
- Park, K., & Kwak, I.-S. (2018). Disrupting effects of antibiotic sulfathiazole on developmental process during sensitive life-cycle stage of *Chironomus riparius*. *Chemosphere*, 190, 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.118>
- Parsell, D. A., & Lindquist, S. (1993). THE FUNCTION OF HEAT-SHOCK PROTEINS IN STRESS TOLERANCE: DEGRADATION AND REACTIVATION OF DAMAGED PROTEINS. *Annual*

Review of Genetics, 27(1), 437-496.

<https://doi.org/10.1146/annurev.ge.27.120193.002253>

Planelló, R., Herrero, Ó., Gómez-Sande, P., Ozáez, I., Cobo, F., & Servia, M. J. (2015). Ecdysone-Related Biomarkers of Toxicity in the Model Organism *Chironomus riparius*: Stage and Sex-Dependent Variations in Gene Expression Profiles. *PLoS One*, 10(10), e0140239.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140239>

Planelló, R., Martínez-Guitarte, J. L., & Morcillo, G. (2010). Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone-nuclear receptor genes in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Science of The Total Environment*, 408(7), 1598-1603. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.01.004>

Qiao, R., Mortimer, M., Richter, J., Rani-Borges, B., Yu, Z., Heinlaan, M., Lin, S., & Ivask, A. (2022). Hazard of polystyrene micro-and nanospheres to selected aquatic and terrestrial organisms. *Science of The Total Environment*, 853, 158560.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158560>

Quiroga, D., Fernández, R., & París, E. (2010). *Salud ambiental infantil: Manual para enseñanza de grado en escuelas de medicina* (1ª).

Revel, M., Châtel, A., & Mouneyrac, C. (2018). Micro(nano)plastics: A threat to human health? *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 1, 17-23.

<https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.10.003>

Riddiford, L. M., Cherbas, P., & Truman, J. W. (2000). Ecdysone receptors and their biological actions. En *Vitamins & Hormones* (Vol. 60, pp. 1-73). Elsevier.

[https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(00\)60016-X](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(00)60016-X)

Roursgaard, M., Hezareh Rothmann, M., Schulte, J., Karadimou, I., Marinelli, E., & Møller, P. (2022). Genotoxicity of Particles From Grinded Plastic Items in Caco-2 and HepG2 Cells. *Frontiers in Public Health*, 10, 906430. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.906430>

Schwedes, C. C., & Carney, G. E. (2012). Ecdysone signaling in adult *Drosophila melanogaster*.

Journal of Insect Physiology, 58(3), 293-302.

<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.01.013>

Sheehan, G., Garvey, A., Croke, M., & Kavanagh, K. (2018). Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences ? *Virulence*, 9(1), 1625-1639.

<https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1526531>

Shi, M., Chen, X.-Y., Zhu, N., & Chen, X.-X. (2014). Molecular identification of two prophenoloxidase-activating proteases from the hemocytes of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and their transcript abundance changes in response to microbial challenges. *Journal of Insect Science (Online)*, 14, 179.

<https://doi.org/10.1093/jisesa/ieu041>

Siddique, H. R., Gupta, S. C., Mitra, K., Bajpai, V. K., Mathur, N., Murthy, R. C., Saxena, D. K., & Chowdhuri, D. K. (2008). Adverse effect of tannery waste leachates in transgenic *Drosophila melanogaster*: Role of ROS in modulation of Hsp70, oxidative stress and apoptosis. *Journal of Applied Toxicology*, 28(6), 734-748.

<https://doi.org/10.1002/jat.1332>

Siddique, H. R., Mitra, K., Bajpai, V. K., Ravi Ram, K., Saxena, D. K., & Chowdhuri, D. K. (2009). Hazardous effect of tannery solid waste leachates on development and reproduction in *Drosophila melanogaster*: 70kDa heat shock protein as a marker of cellular damage. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(6), 1652-1662.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.06.010>

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

Torres-Ruiz, M., De la Vieja, A., de Alba Gonzalez, M., Esteban Lopez, M., Castaño Calvo, A., & Cañas Portilla, A. I. (2021). Toxicity of nanoplastics for zebrafish embryos, what we

- know and where to go next. *Science of The Total Environment*, 797, 149125.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149125>
- Turna Demir, F., Akkoyunlu, G., & Demir, E. (2022). Interactions of Ingested Polystyrene Microplastics with Heavy Metals (Cadmium or Silver) as Environmental Pollutants: A Comprehensive In Vivo Study Using *Drosophila melanogaster*. *Biology*, 11(10), 1470.
<https://doi.org/10.3390/biology11101470>
- Ureña, E., Manjón, C., Franch-Marro, X., & Martín, D. (2014). Transcription factor E93 specifies adult metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(19), 7024-7029.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1401478111>
- Urien Crespo, M. J. (20017). *Análisis de supervivencia de Chironomus riparius expuesto a sustancias que contaminan el medio ambiente*. Universidad Nacional de Educación a Distancia (España). Facultad de Ciencias.
- USEPA. (2000). *Methods of measuring the toxicity and bioaccumulation of sediments associated contaminants with freshwater invertebrates, second edition* [600/R-99/064]. United States Environmental Protection Agency.
- Uyehara, C. M., Nystrom, S. L., Niederhuber, M. J., Leatham-Jensen, M., Ma, Y., Buttitta, L. A., & McKay, D. J. (2017). Hormone-dependent control of developmental timing through regulation of chromatin accessibility. *Genes & Development*, 31(9), 862-875.
<https://doi.org/10.1101/gad.298182.117>
- Wang, X., Chen, M., Zhou, J., & Zhang, X. (2014a). HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy. *International Journal of Oncology*, 45(1), 18-30.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2399>
- Wang, X., Chen, M., Zhou, J., & Zhang, X. (2014b). HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy. *International Journal of Oncology*, 45(1), 18-30.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2399>

- Wang, Z., Fan, L., Wang, J., Xie, S., Zhang, C., Zhou, J., Zhang, L., Xu, G., & Zou, J. (2021). Insight into the immune and microbial response of the white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* to microplastics. *Marine Environmental Research*, *169*, 105377. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2021.105377>
- Weber, A. M., & Ryan, A. J. (2015). ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, *149*, 124-138. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.12.001>
- Weltje, L., & Bruns, E. (2009). *The chironomid life-cycle test* (Validation Report First draft; p. 20). OCDE. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/44082677.pdf>
- Xie, Z., Tang, J., Wu, X., Fan, S., Cheng, H., Li, X., & Hua, R. (2019). Bioconcentration and ecotoxicity of sulfadiazine in the aquatic midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *66*, 69-74. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.12.021>
- Yao, T.-P., Segreaves, W. A., Oro, A. E., McKeown, M., & Evans, R. M. (1992). *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, *71*(1), 63-72. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90266-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90266-F)

ANEXO IX

Título del Trabajo: Evaluación del daño en el ADN y de los efectos moleculares y celulares de los nanoplasticos (NPs) de poliestireno (PS) en *Chironomus riparius*.

Este trabajo ha sido realizado en la Universidad Nacional de Educación a Distancia, en el Grupo de Biología y Toxicología Ambiental, perteneciente al Departamento de Física Matemática y de Fluidos de la Facultad de Ciencias.



Tutor/es: Mónica Morales Camarzana y Raquel Martín Folgar. UNED.